

**Untersuchungen zum Einfluss von Redoxpotential und  
alternativen Elektronenakzeptoren als Umweltfaktoren auf  
die reduktive Dehalogenierung von Tetrachlorethen in  
*Sulfurospirillum multivorans***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



---

seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe Raffael Rubick

geboren am 24. März 1976 in Zwickau

Jena

November 2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gabriele Diekert (Universität Jena)
2. Prof. Dr. Kirsten Küsel (Universität Jena)
3. Prof. Dr. Gottfried Uden (Universität Mainz)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22. März 2011



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>II</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>VIII</b>
<b>III</b>	<b>Summary</b>	<b>X</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Boden-Aquifer-Systeme	1
1.2.	Schadstoffe im Boden	2
1.3.	Ausbildung von Stoff- und Redox-Gradienten	3
1.4.	Dehalogenierung durch Mikroorganismen	4
1.5.	Einfluss von Sauerstoff	7
1.6.	Reduktive Dehalogenasen	9
1.7.	Regulation der Dehalogenasen	11
1.8.	Zielstellung	13
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1.	Organismen	14
2.2.	Kultivierung	14
2.2.1.	Langzeitkultivierung	16
2.2.2.	Kultivierung in kleinem Maßstab	16
2.2.3.	Kultivierung im Fermenter	16
2.2.4.	Wachstum mit Sauerstoff	17
2.2.5.	Gewinnung von Einzelkolonien	17
2.2.6.	Ruhende Zellen	17
2.2.7.	Bestimmung von Zelldichte, pH-Wert und Redoxpotential	18
2.3.	Analytische Methoden	18
2.3.1.	Fumarat- und Pyruvatbestimmung	18
2.3.2.	Acetatbestimmung	18
2.3.3.	Bestimmung der Lactatkonzentration	19
2.3.4.	Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumbestimmung	20
2.3.5.	Konzentrationsbestimmung von Nicotinamidadeninindinukleotiden	21
2.3.6.	Gase und andere flüchtige Verbindungen	22
2.3.7.	Proteinbestimmung	23
2.4.	Enzymaktivitäten	24
2.4.1.	PCE-Dehalogenase	24
2.4.2.	Fumarat-Reduktase	24
2.4.3.	Nitrat-Reduktase	25
2.4.4.	$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase	25
2.4.5.	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	25
2.4.6.	Oxidase-Test	25
2.4.7.	Aktivitäten O <sub>2</sub> -entgiftender Enzyme	26
2.5.	Subzelluläre Fraktionierung	27
2.5.1.	Zellfraktionierung	27
2.5.2.	Solubilisierung von Membranproteinen	27
2.6.	Herstellung des Rohextraktes für DNA-Protein-Interaktionsversuche	28
2.7.	Molekularbiologische Methoden	29
2.7.1.	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. multivorans</i>	29
2.7.2.	DNA-Gelelektrophorese	29
2.7.3.	Herstellung von DNA-Fragmenten zur Anreicherung DNA-bindender Proteine	29
2.7.4.	RT-PCR-Analysen des <i>pceA</i> -Transkripts	30
2.8.	Proteinbiochemische Methoden	31

2.8.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.8.2.	2D-Elektrophorese	31
2.8.3.	Massenspektrometrie	32
2.8.4.	Western-Blot	33
2.8.5.	Anreicherung DNA-bindender Proteine im Promotorbereich von <i>pceAB</i>	34
<b>2.9.</b>	<b>Redoxpotential im Medium</b>	<b>35</b>
2.9.1.	Potentiostat-regulierte Kultivierung	35
2.9.2.	Einsatz von Mediatoren und redoxaktiven Verbindungen	37
2.9.3.	Einstellen des Redoxpotentials durch Titration	37
<b>2.10.</b>	<b>Sonstige Methoden</b>	<b>38</b>
2.10.1.	Herstellung von Titan(III)-citrat	38
2.10.2.	Verwendete Chemikalien und Gase	38
2.10.3.	Datenauswertung	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
<b>3.1.</b>	<b>Redoxpotential</b>	<b>39</b>
3.1.1.	Redoxpotential während der Kultivierung von <i>S. multivorans</i>	39
3.1.2.	Veränderung von $E_{SHE}$ durch redoxaktive Substanzen	41
3.1.3.	Regulierung des Redoxpotentials mit einem Potentiostaten	46
<b>3.2.</b>	<b>Wachstum mit Sauerstoff</b>	<b>53</b>
3.2.1.	Einfluss der $O_2$ -Konzentration auf das Wachstum	53
3.2.2.	Wachstum mit Pyruvat und Sauerstoff	56
3.2.3.	Wachstum mit Pyruvat, Sauerstoff und PCE	57
3.2.4.	Umsatz von Pyruvat, Fumarat und PCE in Gegenwart von $O_2$	59
3.2.5.	Enzyme des $O_2$ -Stoffwechsels	60
<b>3.3.</b>	<b>Wachstum mit alternativen Elektronenakzeptoren</b>	<b>62</b>
3.3.1.	Nitrat als Elektronenakzeptor	62
3.3.2.	Fumarat als einziges Substrat	64
<b>3.4.</b>	<b>Zusammenfassung der Wachstumsparameter</b>	<b>65</b>
<b>3.5.</b>	<b>Langzeitkultivierung von <i>S. multivorans</i></b>	<b>66</b>
3.5.1.	Aktivität der PCE-Dehalogenase	66
3.5.2.	Aktivitäten anderer respiratorischer Enzyme	72
3.5.3.	Expression der PCE-Dehalogenase	74
3.5.4.	Transkript von <i>pceA</i>	78
<b>3.6.</b>	<b>Induktion der PCE-Dehalogenase</b>	<b>79</b>
<b>3.7.</b>	<b>Proteomanalysen</b>	<b>81</b>
3.7.1.	Lösliche Proteine bei Wachstum mit verschiedenen Substraten	81
3.7.2.	Identifizierung respiratorischer Enzyme der Membranfraktion	84
3.7.3.	Interaktion von Proteinen in der Promotorregion von <i>PceA</i>	87
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
4.1.	Einfluss des Redoxpotentials auf die reduktive Dechlorierung	90
4.2.	Sauerstoff als Elektronenakzeptor	96
4.3.	$O_2$ -entgiftende Enzyme	100
4.4.	Einfluss alternativer Elektronenakzeptoren auf die reduktive Dechlorierung	101
4.5.	Langzeitregulation der PCE-Dehalogenase	103
4.6.	Proteomanalysen	107
4.7.	Abschlussbemerkungen	110
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>125</b>
	Danksagung	125
	Ehrenwörtliche Erklärung	126
	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	127

## I Abkürzungsverzeichnis

AA/Bis	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin
BV	Benzylviologen (1,1'-Dibenzyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid)
CoA	Coenzym A
cDCE/DCE	<i>cis</i> -Dichlorethen/Dichlorethen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
$E^{0'}$	Redoxpotential unter Standardbedingungen bei pH 7,0
$E_{SHE}$	Redoxpotential bezogen auf Standard-Wasserstoffelektrode
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
$\alpha$ KGDH	$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LMW-Marker	Low Molecular Weight Marker
LtQ	Linear Ion Trap Quadrupol
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
CID	Collision Induced Dissociation
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MV	Methylviologen
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamadenindinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NaPP	Natriumphosphatpuffer
OD	Optische Dichte
PBST	Phosphate Buffered Saline with Tween® 20
PCE	Tetrachlorethen (Perchlorethylen)
PceA <sup>+</sup> /PceA <sup>-</sup>	PCE-Dehalogenase positiv/negativ
matPceA	prozessierte PCE-Dehalogenase
prePceA	PCE-Dehalogenase mit TAT-Signalpeptid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFOR	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMS	Phenazinmethosulfat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RE	Referenzelektrode
RP	<i>Reverse Phase</i> , Umkehrphase
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SOD	Superoxid-Dismutase
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

TAT	Twin arginine translocation
TCC	Tricarmonic acid cycle
TCE	Trichlorethen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V/V	Volumen pro Volumen
m/V	Masse pro Volumen
XOD	Xanthin-Oxidase

## II Zusammenfassung

Weltweit werden Boden und Grundwasser durch halogenierte Kohlenwasserstoffe belastet. Es existieren zahlreiche Mikroorganismen, die unter anaeroben Bedingungen zur reduktiven Dehalogenierung von Tetrachlorethen (PCE) befähigt sind. In der vorliegenden Arbeit wurden Einflüsse verschiedener potentieller Umweltfaktoren auf den PCE-Abbau und die Organohalid-Respiration in *Sulfurospirillum multivorans* untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit vom Wachstumssubstrat das Redoxpotential im Medium im Laufe der Kultivierung einen Wert zwischen -250 mV und -50 mV einnimmt. Das Redoxpotential des Mediums wurde durch den Einsatz von Elektroden und redoxaktiver Verbindungen über einen Bereich von +400 mV bis -600 mV variiert. Unter diesen Bedingungen wurde die Organohalid-Respiration nur im geringem Maße beeinflusst. Jedoch änderte sich in den Zellen das Verhältnis von  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  bei steigendem Redoxpotential des Mediums.

Das Gram-negative  $\epsilon$ -Proteobakterium *S. multivorans* wurde bisher als strikt anaerob beschrieben. Unter speziellen Laborbedingungen konnte ein Wachstum in Gegenwart von bis zu 20 % Sauerstoff (100 % Luft) in der Gasphase mit Pyruvat als Elektronendonator nachgewiesen werden. Die größte Zellausbeute lag bei 10 %  $\text{O}_2$  in der Gasphase. Während des Wachstums von *S. multivorans* wurden Sauerstoff und Pyruvat verbraucht. Die Aktivitätsmessungen von Katalase, Superoxid-Dismutase und NADH-Oxidase bestätigten das Vorkommen von Enzymsystemen zur Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und molekularem  $\text{O}_2$ . Darüber hinaus konnte das Vorhandensein von Cytochrom-Oxidase nachgewiesen werden. Daher ist *S. multivorans* offenbar in der Lage unter mikroaeroben Bedingungen zu wachsen.

Die Nutzung von Pyruvat als Elektronendonator war nur möglich, wenn ein Elektronenakzeptor wie Fumarat, Nitrat, Sauerstoff oder PCE vorhanden waren. Der Umsatz von PCE fand auch in Anwesenheit der alternativen Elektronenakzeptoren Fumarat und Nitrat statt. Die Dechlorierung von PCE und Reduktion dieser Substrate erfolgte dabei gleichzeitig. Eine Hemmung des PCE-Umsatzes in Gegenwart von Sauerstoff fand nur bei Formiat als Elektronendonator statt.

Andauernde Kultivierung in Abwesenheit von PCE und TCE führten zum Verlust der Aktivität der PCE-Dehalogenase (PceA). Durch Immunoblots mit Antikörpern gegen PceA und Transkriptanalysen von *pceA* wurde der Verlust von Synthese und Expression der PCE-



Dehalogenase bei verschiedenen Substratkombinationen in Abwesenheit von PCE gezeigt. Eine Besonderheit lag darin, dass diese Regulation erst nach einer Zeitdauer von bis zu 100 Generationen auftrat. Das Enzym war durch Zugabe seines Substrates wieder induzierbar. Ein Verlust der Synthese von *pceA* aufgrund von Mutationen oder Verlust des kodierenden Gens konnte ausgeschlossen werden. Der Beleg dafür erfolgte mittels Induktionsversuchen in Einzelkolonien mit Zellen, die kein PceA enthielten (PceA<sup>-</sup>).

Durch Aktivitätsmessungen und Proteomanalysen konnte eine Regulation in Abhängigkeit von Wachstumssubstraten bei weiteren Enzymen des Energiestoffwechsels nicht beobachtet werden. Ein Einblick in die Regulationsmechanismen der Expression der PCE-Dehalogenase durch Proteomanalysen ist angestrebt und konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abgeschlossen werden.

### III Summary

Tetrachloroethene (PCE) is among the most ubiquitous contaminants in aquifers and is degradable to less chlorinated ethenes by microorganisms under reductive conditions. Due to the activity of aerobic and anaerobic bacteria, and depending on the composition of the sediment, a substrate and redox gradient is formed in contaminated groundwater. The anaerobic bacterium *Sulfurospirillum multivorans* can couple the reductive dechlorination of PCE to energy conversion *via* chemiosmotic mechanism (dehalorespiration). In this study the influence of different alternative electron acceptors and the redox potentials on the reductive dechlorination of PCE by *S. multivorans* was investigated.

During the growth of *S. multivorans* the redox potential of the cultivation media changed and was, depending on the used substrates, adjusted to values between -250 mV and -50 mV. The redox potential of the medium was adjusted by the usage of redox active compounds and by potentiostat-controlled graphite electrodes. There was only a little impact on the dechlorination of PCE when the redox potential of the media was adjusted between +400 mV and -600 mV.

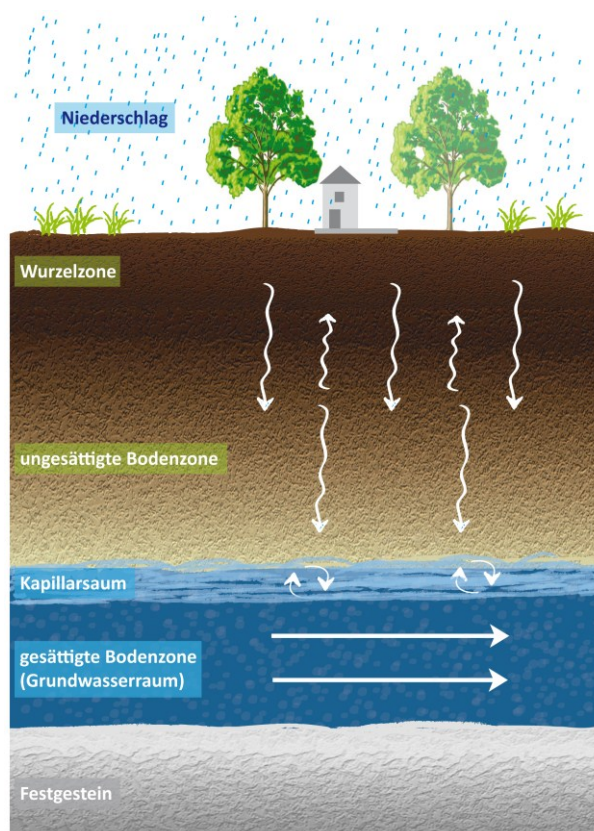
It could be demonstrated that *S. multivorans* is able to grow in the presence of up to 20 % O<sub>2</sub> in the gas phase of closed cultivation vessels and pyruvate as electron donor. The optimal growth was observed with 10 % O<sub>2</sub> in the gas phase. During growth oxygen and pyruvate are consumed. Furthermore the presence of oxygen reducing enzymes (cytochrome c oxidase, NADH oxidase) and reactive oxygen species detoxifying enzymes (catalase, superoxide dismutase) could be shown in crude extracts of *S. multivorans*. This indicates, *S. multivorans* is a microaerobic organism. The dechlorination of PCE was not inhibited in the presence of the alternative electron acceptors fumarate, nitrate and oxygen, respectively, in combination with pyruvate as electron donor.

During long term cultivation with different substrates in the absence of PCE or trichloroethene (TCE) the activity of the PCE dehalogenase (PceA) was lost attended with a loss of *pceA* gene expression and protein biosynthesis of PceA after more than 60 generations. However, the PCE dehalogenase in PceA depleted (PceA<sup>-</sup>) cells was inducible with PCE or TCE. It was shown that long-term cultivated cells still contain the functional *pceA* gene.

# 1. Einleitung

## 1.1. Boden-Aquifer-Systeme

Ein Aquifer ist der Teil der Lithosphäre, in dem das Grundwasser lokalisiert ist, und wird auch als Grundwasserleiter bezeichnet (Abbildung 1). Hierbei handelt es sich um Grundwasserführende Schichten, die durch wasserundurchlässige Schichten (Aquifugen) begrenzt werden. Das Grundwasser befindet sich in den Bodenzone, die permanent mit Wasser gesättigt sind (gesättigte Bodenzone) sowie in darunterliegenden wasserdurchlässigen Gesteinsschichten.



**Abbildung 1. Gliederung von Boden- und Grundwasserzonen als Teil der Lithosphäre**

Dargestellt sind die teil- und zeitweise oder permanent vollständig mit Wasser gefüllten Zonen des Bodens und tieferen Untergrundes. Pfeile verdeutlichen Fließrichtung des Boden- und Grundwassers, als Teil des irdischen Wasserkreislaufes (durch Niederschläge zugeführt). Grundwasserraum: Aquifer; (modifiziert nach Schwoerbel & Brendelberger 2005)

Im Gegensatz dazu ist die ungesättigte Bodenzone nicht ununterbrochen von Wasser durchflutet. In ihr enthaltenes Wasser wird durch Kapillarkräfte und Oberflächenspannung beeinflusst und bewegt sich vorwiegend vertikal. Dagegen unterliegt Grundwasser hauptsächlich einer horizontalen Bewegung, die durch Gravitationskräfte hervorgerufen wird. Zwischen gesättigter und ungesättigter Bodenzone befindet sich der Kapillarsaum. In

diesem Bereich kann Grundwasser durch Kapillarkräfte von der gesättigten in die ungesättigte Bodenzone aufsteigen. Grundwasser ist ein wichtiger Bestandteil des globalen Wasserkreislaufes und besitzt eine große Bedeutung als Trinkwasser. In Deutschland werden zwei Drittel des Trinkwassers aus Grundwasser gewonnen (Umweltbundesamt 2006). Da Trinkwasser ein unverzichtbares Allgemeingut darstellt, ist ein besonderer Schutz des Grundwassers notwendig.

### **1.2. Schadstoffe im Boden**

EU- und weltweit wird das Grundwasser durch zahlreiche chemische Verbindungen beeinträchtigt. Dazu zählen unter anderem Mineralöl, Schwermetalle, Polzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), Aromatische Kohlenwasserstoffe, Phenole sowie chlorierte und andere halogenierte Verbindungen (EEA 2007, US EPA 2004). Diese Verbindungen stehen im Verdacht, giftige, kanzerogene, mutagene und sedative Eigenschaften zu besitzen. Weiterhin akkumulieren sie im Gewebe, sind persistent und reichern sich in der Nahrungskette an. Die Europäische Umweltagentur (EEA, European Environmental Agency) geht von schätzungsweise 250.000 Standorten aus, an denen auf Grund von chemischen Verunreinigungen Gefahren für die menschliche Gesundheit und für Ökosysteme bestehen (Bombach *et al.* 2010, EEA 2007).

Die Verunreinigungen gelangen vom Einleitungssort aus in das Boden-Aquifer-System und damit in den natürlichen Wasserkreislauf. Sie verweilen persistent im Boden über Jahrzehnte hinweg und werden anschließend abhängig vom Grundwasserstrom räumlich verteilt (Ausbildung von Verschmutzungsfahnen, plumes). Sie stellen deshalb eine räumlich und zeitlich ausgedehnte Gefährdung des Trinkwassers dar. Ein großer Anteil dieser Verschmutzungen ist anthropogenen Ursprungs, aus der chemischen Industrie und Landwirtschaft. Allerdings sind bisher mehr als 3500 halogenierte Verbindungen rein natürlichen Ursprungs bekannt, die sowohl von marinen Organismen, Pflanzen, Pilzen, Insekten, Bakterien als auch aus Waldbränden und vulkanischer Aktivität stammen (Gribble 1998).

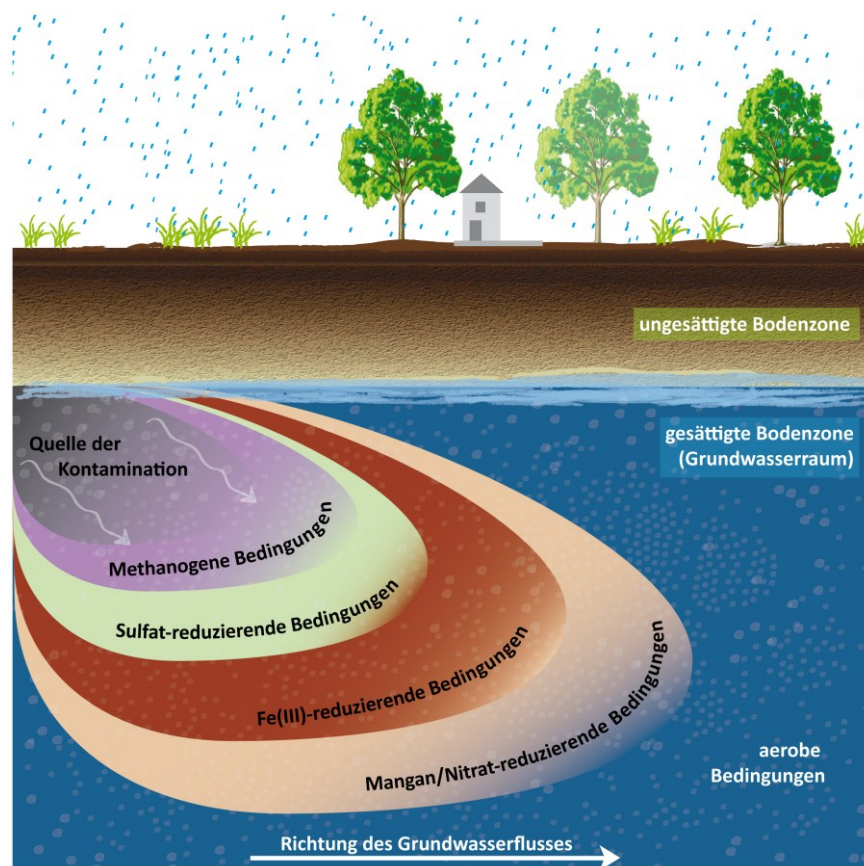
Eine Verringerung der Konzentrationen dieser Verbindungen im Grundwasser durch natürliche Prozesse geschieht hauptsächlich durch Verdunstung, Verdünnung, Sorption und biologischen Abbau (Bombach *et al.* 2010). Der biologische Abbau wird unter aeroben und anaeroben Bedingungen zum größten Teil durch Bakterien bewerkstelligt. Jedoch finden

diese Prozesse über lange Zeiträume statt und sind damit nicht ausreichend geeignet zur Sanierung von Böden und Grundwasser. Bisher wird die Boden- und Grundwassersanierung durch Abtragen des kontaminierten Erdreiches oder Abpumpen des Grundwassers gehandhabt (Pump-and-Treat Verfahren). Diese Maßnahmen sind allerdings sehr kostenintensiv, arbeits- und zeitaufwendig sowie stellen sie einen massiven Eingriff in das Ökosystem dar (Stupp *et al.* 2007).

### 1.3. Ausbildung von Stoff- und Redox-Gradienten

Die Verwertung von organischem Material durch Mikroorganismen im Boden-Aquifer-System erfolgt vorerst unter Verbrauch an Sauerstoff. Zusätzlich führt eine geringe Einströmung von Sauerstoff in Grundwassersysteme zur Bildung von anoxischen Bedingungen und ermöglicht einen anaeroben Abbau von Grundwasserverunreinigungen (Freedman & Gossett 1989; DiStefano *et al.* 1992, Anderson & Lovley 1997, Lovley 2001). Zum weiteren Abbau des organischen Materials werden alternative Elektronenakzeptoren wie Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), Mangan ( $\text{Mn}^{4+}$ ), Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ), Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) oder Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) genutzt (Abbildung 2). Neben der Verfügbarkeit an geeigneten Elektronenakzeptoren spielt auch die Konzentration des Elektronendonors eine entscheidende Rolle. So können beispielsweise Fe(III)-reduzierende Bakterien  $\text{SO}_4^{2-}$ -reduzierende und methanogene Organismen hemmen, indem sie die  $\text{H}_2$ -Konzentration niedrig halten (Heimann *et al.* 2010). In kontaminierten Aquiferen führen diese lokal verfügbaren Elektronenakzeptoren zur Ausbildung von unterschiedlichen Redoxzonen in den Verschmutzungsfahnen (Winderl *et al.* 2008). Die von den Mikroorganismen katalysierten metabolischen Redoxreaktionen bestimmen die Energie, die im Stoffwechsel gewonnen werden kann. Somit sind auch die Abbauraten von Kontaminationen von diesen verschiedenen Redoxprozessen abhängig. Weiterhin kann das Vorkommen eines Elektronenakzeptors die Expression der terminalen Reduktase regulieren, wobei die damit verbundene Energiekonservierung eine entscheidende Rolle spielt (Unden & Bongaerts 1997). Die Energieausbeute aus den vorhandenen Substraten bestimmt, ob ein Abbau der Kontaminationen möglich ist (Röling & van Verseveld 2002, Bombach *et al.* 2010, Heimann *et al.* 2010). Bei der Organohalid-Respiration wird die Grundwasser-verunreinigende Verbindung selbst als Elektronenakzeptor genutzt (Neumann *et al.* 1994, Ye *et al.* 2010, Bombach *et al.* 2010). Allerdings findet der mikrobiologische Abbau von chlorierten Kohlenwasserstoffen nur unter

methanogenen, strikt anaeroben Bedingungen bei einem niedrigen Redoxpotential statt (Vogel *et al.* 1987, Freedman & Gossett 1989). Von verschiedenen Autoren wird postuliert, dass in den Grenzbereichen der Redoxzonen erhöhte mikrobiologische Aktivität vorherrscht. Daher werden diese Bereiche als *hot spots* des Abbaus angesehen (Winderl *et al.* 2008). Die Zusammensetzung der Gemeinschaft von Mikroorganismen scheint einen wichtigen Faktor beim Abbau von Kohlenwasserstoffen darzustellen. Entscheidend dafür ist das Vorkommen von dechlorierenden bzw. schadstoffabbauenden Organismen (Winderl *et al.* 2008).



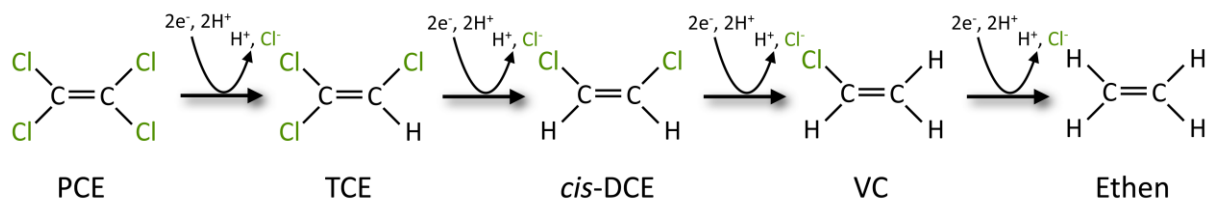
**Abbildung 2. Nutzung von verfügbaren Elektronenakzeptoren durch Mikroorganismen in einer Verschmutzungsfahne in einem Aquifer**

Durch mikrobielle Aktivitäten kommt es an der Quelle einer Grundwasserkontamination zum kompletten Verbrauch an Sauerstoff. Je nach Verfügbarkeit werden, gestaffelt nach der erreichbaren Energieausbeute, von den Mikroorganismen alternative Elektronenakzeptoren genutzt. Das führt, entsprechend der Redoxpotentiale der Verbindungen, zur Ausbildung eines Redoxgradienten im Grundwasser (modifiziert nach Lovley 2001)

### 1.4. Dehalogenierung durch Mikroorganismen

Einen großen Anteil an Umweltverschmutzungen haben halogenierte Verbindungen, insbesondere chlorierte Kohlenwasserstoffe. Diese gelangen durch den Einsatz als Pestizide (DDT, Lindan), Lösungsmittel (Tetrachlorethen, Trichlorethen), Fungizide im Holzschutz (Pentachlorphenol, Hexachlorbenzol) und andere Industriechemikalien (Tetrachlormethan)

in die Umwelt. Sehr verbreitete Chlorkohlenwasserstoffe im Grundwasser sind Tetrachlorethen (PCE), Trichlorethen (TCE), Dichlorethen (DCE) und Vinylchlorid (VC) (Fetzner 1998). Neben chlorierten sind auch bromierte Alkene häufig vorkommende Kontaminanten von Boden und Grundwasser (Ye *et al.* 2010). Diese halogenierten Alkene können durch Mikroorganismen dechloriert werden. Dabei wird PCE schrittweise zu Vinylchlorid und Ethen reduziert (Abbildung 3).



**Abbildung 3. Reduktive Dechlorierung von Tetrachlorethen zu Ethen mit Zwischenprodukten unter anaeroben Bedingungen**

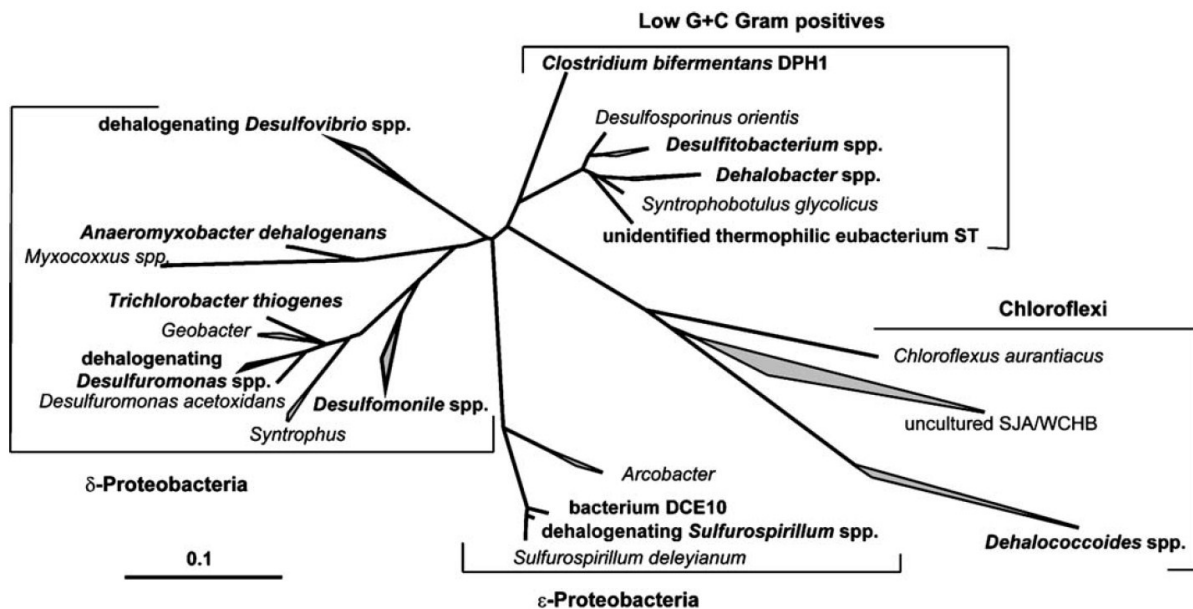
**PCE:** Tetrachlorethen, **TCE:** Trichlorethen, **cis-DCE:** cis-Dichlorethen, **VC:** Vinylchlorid

Wenn dieser Prozess der reduktiven Dehalogenierung an die Energiegewinnung über Elektronentransportphosphorylierung (ETP) gekoppelt ist, bezeichnet man ihn als Organohalid-Respiration (Holliger *et al.* 1998, Ye *et al.* 2010). Tetrachlorethen, sowie andere chlorierte aliphatische Verbindungen und Chlorphenole stellen dabei mit ihren positiven Redoxpotentialen gute Elektronenakzeptoren dar (z. B.  $E^0$  PCE/TCE +580 mV) (Vogel *et al.* 1987).

Der mikrobielle Abbau chlorierter Verbindungen ist für zahlreiche Bakterien beschrieben worden (Smidt & de Vos 2004) und erfolgt überwiegend unter anoxischen, reduzierenden Bedingungen (Fetzner 1998). Die Abbildung 4 gibt einen Überblick über die phylogenetische Einordnung dieser Bakterien in vier verschiedene Gruppen.

Die reduktive Dechlorierung wurde erstmals bei *Desulfomonile tiedjei* nachgewiesen, einem Bakterium der  $\delta$ -Proteobakterien (deWeerd & Suflita 1990, Mohn & Tiedje 1990). Weitere Vertreter dieser Gruppe sind *Desulfuromonas michiganensis* (Sung *et al.* 2003), *Anaeromyxobacter dehalogenans* (He *et al.* 2002), *Desulfovibrio dechloracetivorans* (Sun *et al.* 2000) sowie *Geobacter thiogenes* (De Wever *et al.* 2000, Nevin *et al.* 2007). Zu den dechlorierenden  $\epsilon$ -Proteobakterien zählen Arten der Gattung *Sulfurospirillum* spp. wie *S. multivorans* (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995) und *S. halospirans* (Luijten *et al.* 2003). In der phylogenetischen Gruppe der Chloroflexi finden sich dechlorierende Organismen wie *Dehalococcoides* Arten (Smidt & de Vos 2004). Die Gruppe der Gram-positiven Organismen

mit niedrigem GC-Gehalt beinhaltet einige Vertreter, die zur reduktiven Dechlorierung von PCE befähigt sind. Dazu zählen *Desulfitobacterium* spp., wie beispielsweise *D. hafniense* Stamm PCE-S (Miller *et al.* 1997), *D. hafniense* Stamm Y51 (Suyama *et al.* 2001) oder *Dehalobacter restrictus* (Holliger *et al.* 1998).



**Abbildung 4. Phylogenetische Einordnung dechlorierender Bakterien (Smidt & de Vos 2004)**

Einteilung erfolgte auf Grund der Sequenzunterschiede der bakteriellen 16S rRNA Gene. Maßstab 0.1 entspricht 10 % Sequenzunterschied

*Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 ist das einzige beschriebene Bakterium, das PCE vollständig zu Ethen dechlorieren kann. Dabei ist der Abbau von Vinylchlorid zu Ethen ein kometabolischer Prozess und nicht an Energiegewinnung gekoppelt (Maymó-Gatell *et al.* 1997). In der Regel erfolgt der Abbau von PCE jedoch nur unvollständig zu DCE, wie z. B. durch *Dehalobacter restrictus*, *Desulfitobacterium hafniense* Stamm PCE-S, TCE1 und Y51 sowie *Sulfurospirillum multivorans*. Die Dechlorierung von PCE findet bei *Desulfitobacterium hafniense* Stamm PCE1 nur bis zum TCE statt (Gerritse *et al.* 1996). Das ist in Hinblick auf eine biologische Sanierung von Altlasten von Bedeutung, da TCE und DCE selbst Kontaminationen darstellen. Die reduktive Dehalogenierung von Vinylchlorid zu Ethen wurde bisher bei *Dehalococcoides* Stamm VC1 (Müller *et al.* 2004) und Stamm BAV1 (Krajmalnik-Brown *et al.* 2004) beschrieben. Eine aktuelle Studie belegt, dass auch bromierte Alkene als Elektronenakzeptoren in der Organohalid-Respiration von *S. multivorans* und *D. hafniense* PCE-S genutzt werden (Ye *et al.* 2010). Tribromethen (TBE) kann von



*D. hafniense* PCE-S vollständig zu Ethen dehalogeniert werden, während der Abbau von TBE durch *S. multivorans* bis zum Vinylbromid erfolgt (Ye *et al.* 2010).

*S. multivorans* ist ein Gram-negatives  $\epsilon$ -Proteobakterium, welches aus einem mit chlorierten Ethenen verunreinigten Belebtschlammbecken angereichert wurde (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995). Es ist in der Lage, mit PCE und TCE Organohalid-Respiration zu betreiben. Als Elektronendonoren können dabei Formiat und Wasserstoff genutzt werden. Alternativ werden weitere Elektronendonoren wie Pyruvat, Lactat, Glycerol oder  $\text{Na}_2\text{S}$  verwertet. Fumarat und Nitrat werden als alternative Elektronenakzeptoren genutzt. Viele reduktiv dechlorierende Bakterien besitzen ein ähnlich breites Substratspektrum, das bis hin zu polychlorierten Dioxinen (Bunge *et al.* 2003) reicht. Allerdings sind bisher auch drei Organismen (*Dehalobacter restrictus*, *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195, *Dehalococcoides* Stamm CBDB1) beschrieben worden, die ausschließlich mit Wasserstoff als Elektronendonor und chlorierten Verbindungen als Elektronenakzeptoren wachsen. Die Dechlorierung von PCE durch *Clostridium bifermentas* DPH1 konnte nicht, wie ursprünglich behauptet (Chang *et al.* 2000), bestätigt werden (Flechter *et al.* 2008).

### 1.5. Einfluss von Sauerstoff

Der Lebensraum im Boden oder Aquifer kann zumindest zeitweise Sauerstoff enthalten und somit kommen auch die darin lebenden Mikroorganismen damit in Berührung. Aerobe Mikroorganismen nutzen dabei Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor und tolerieren Luftsauerstoff, während Mikroaerophile nur bei  $\text{O}_2$ -Konzentrationen kleiner 21 % überleben können. Aerotolerante Mikroorganismen können in Anwesenheit von Sauerstoff wachsen aber nutzen ihn jedoch nicht zur Energiegewinnung. Sind Mikroorganismen in ihrem Lebensraum der Gegenwart von Sauerstoff ausgesetzt, kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dabei handelt es sich um teilweise reduzierten Sauerstoff in Form von Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Hydroxylradikalen ( $\text{OH}\cdot$ ). Im Gegensatz zu molekularem Sauerstoff können ROS, insbesondere  $\text{OH}\cdot$ , Nukleinsäuren spalten und Proteine sowie Fettsäuren oxidieren (Imlay 2003, Diaz *et al.* 2006). Darüber hinaus werden Übergangsmetalle, die häufig als Cofaktoren in Enzymen fungieren, leicht durch molekularen Sauerstoff oxidiert. Insbesondere Eisen-Schwefel-Zentren werden durch  $\text{O}_2$  angegriffen (Flint *et al.* 1993, Imlay 2003). Zur Entgiftung der ROS existieren zahlreiche

Enzymsysteme. Dazu zählen Katalasen, Peroxidasen, Superoxid-Reduktase und Superoxid-Dismutasen (SOD).

Bei der Reaktion von  $O_2$  mit Redoxzentren von Elektronen-übertragenden Enzymen entstehen in allen Zellen unbeabsichtigt Sauerstoffanionen ( $O_2^-$ ) (van Loon *et al.* 1986, Carlioz & Touati 1986, Chang *et al.* 1991, Imlay 2003). Diese werden jedoch nicht durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff an den Cytochrom-Oxidasen freigesetzt, sondern durch Autoxidation der respiratorischen Dehydrogenasen (Minghetti & Gennis 1988, Imlay & Fridovich 1991, Gonzalez-Flecha & Demple 1995, Imlay 1995, Messner & Imlay 1999). Durch Reaktionen von reduziertem FAD mit  $O_2$  können  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  freigesetzt werden, wobei die Rate der Freisetzung von der  $O_2$ -Konzentration abhängt (Messner & Imlay 1999, Messner & Imlay 2002). Die Konzentrationen an  $O_2^-$  *in vivo* liegt allerdings auf Grund der Aktivität der SOD in *E. coli* bei rund einem Molekül pro Zelle. Jedoch wird das Wachstum aerober Organismen unter hyperoxischen Bedingungen inhibiert, was auf eine steigende Konzentration an  $O_2^-$  in den Zellen zurückgeführt wird (Imlay & Fridovich 1991, Gort & Imlay 1998, Imlay 2003).

Die unterschiedliche Toleranz der Mikroorganismen gegenüber Sauerstoff, wurde in der Vergangenheit auf das Vorkommen bzw. Fehlen verschiedener Enzymsysteme zur Beseitigung der ROS zurückgeführt (McCord & Fridovich 1969, McCord *et al.* 1971). Dagegen zeigen aktuelle Arbeiten, dass auch strikt anaerobe Organismen diese ROS-entgiftenden Enzyme besitzen (Jenney *et al.* 1999, Lombard *et al.* 2000). Auch sind viele anaerobe Organismen in der Lage, in aerober Umgebung ohne Wachstum zu überleben (Diaz *et al.* 2006, Hillmann *et al.* 2008, Riebe *et al.* 2009). So werden Anaerobe nicht nur durch ROS beschädigt sondern auch durch Sauerstoff selbst (Massey *et al.* 1969, McCord & Fridovich 1969, Kroll *et al.* 1995, Griffiths & Cooney 2002, Imlay 2003). Viele Elektronen-übertragende Enzyme von Anaerobiern besitzen ein niedriges Redoxpotential und sind deshalb anfällig gegenüber Sauerstoff (Imlay 1995).

Bei Kontakt von anaeroben Bakterien mit Sauerstoff und ROS wird eine globale Stressantwort ausgelöst. So erfolgt die Aktivierung von OxyR, ein redox-sensitives Protein, durch Wasserstoffperoxid (Rocha & Smith 1999, Rocha *et al.* 2000). In *Clostridium acetobutylicum* werden als Antwort auf oxidativen Stress Rubrerythrin-codierende Gene massiv transkribiert (May *et al.* 2004). Ebenfalls das in vielen Anaerobiern konservierte Redoxprotein Rubredoxin wird exprimiert und synthetisiert. Beide Proteine

besitzen eine wichtige Funktion in der Entgiftung von ROS. Es konnte gezeigt werden, dass Elektronen vom NADH-Pool auf eine NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase, Rubredoxin und anschließend auf Ruberythrin übertragen werden (Hillmann *et al.* 2008). Letzteres besitzt Peroxidase-Aktivität und katalysiert die Umwandlung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  (Lumppio *et al.* 2001). In Verbindung mit weiteren Proteinen konnte Reduktaseaktivität mit  $\text{O}_2^-$ , NO und  $\text{O}_2$  gezeigt werden (Riebe *et al.* 2009).

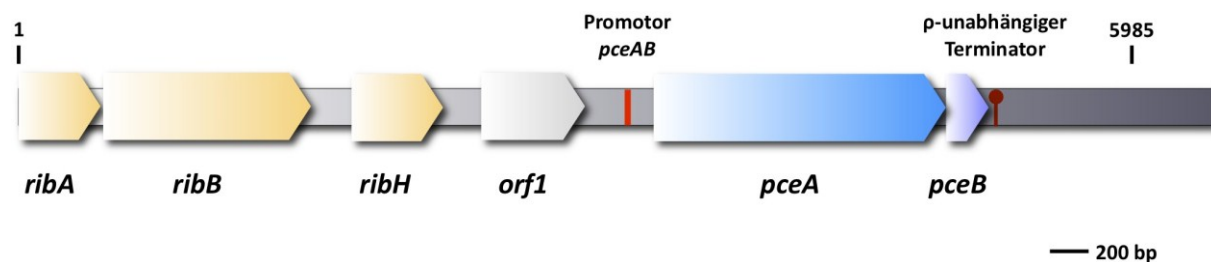
In der phylogenetischen Gruppe der  $\epsilon$ -Proteobakterien gibt es neben aeroben und anaeroben Organismen auch aerotolerante und mikroaerophile. Zum Beispiel wachsen verschiedene *Wollinella* spp. und *Bacteroides* spp., die zur Gruppe der Campylobacter gehören, mit bis zu 5 %  $\text{O}_2$ , obwohl sie bisher als Anaerobe beschrieben wurden (Han *et al.* 1991). Die Fähigkeit zur Nutzung von Sauerstoff als Elektronenakzeptor wurde für *Wollinella succinogenes* nachgewiesen. Zusätzlich besitzen viele *Bacteroides* spp. und *Wollinella* spp. Oxidasen und Cytochrome (Han *et al.* 1991). Arten aus der Gruppe der Campylobacter wie z. B. *W. succinogens* stehen in enger Verwandtschaft zur Gattung *Sulfurospirillum* und damit zu anaeroben Dehalogenierern (Jensen & Finster 2005, Schmitz & Diekert 2003). In der Gattung *Sulfurospirillum* befinden sich einige Vertreter wie *S. deleyianum* oder *S. barnesii*, die als aerotolerant bzw. mikroaerophil eingestuft sind. (Luijten *et al.* 2003). Wachstum von *S. arcachonense* konnte mit bis zu 15 %  $\text{O}_2$  in der Gasphase nachgewiesen werden (Finster *et al.* 1997). Der Nachweis von Katalaseaktivität gelang bisher für *S. carboxydovorans* und *S. arcachonense*. Zusätzlich konnte bei *S. deleyianum* das Vorkommen einer Cytochrom c-Oxidase gezeigt werden (Jensen & Finster 2005). Allerdings stehen detailliertere Untersuchungen zu Sauerstoffverbrauch, ROS-Entgiftung und besonders über den Einfluss von  $\text{O}_2$  auf die Dehalogenierung von PCE noch aus.

### 1.6. Reduktive Dehalogenasen

Die bisher charakterisierten reduktiven Dehalogenasen zeichnen sich durch ein großes Substratspektrum aus, das chlorierte und bromierte Ethene (PCE, TCE, DCE, TBE, DBE), Chlorphenole (Tetrachlorphenylacetat, Tetrachlorphenol), sowie Chlorpropene (2,3-Dichlor-1-Propen, *trans*-1,3-Dichlorpropen) umfasst (Smidt & de Vos 2004). Die meisten der bisher charakterisierten PCE- und Chlorphenol-Dehalogenasen (PceA bzw. CprA) enthalten zwei Eisen/Schwefel-Zentren sowie einen Corrinoide-Cofaktor (Cobalamin), der für die reduktive

Eliminierung der Halogenatome essentiell ist (Holliger *et al.* 1998, Siebert *et al.* 2002, Smidt & de Vos 2004). Die molekularen Massen der Enzyme liegen zwischen 48 und 65 kDa. Die PCE-Dehalogenasen (PceA) tragen am N-Terminus der Proteinsequenz ein Tat-Sequenzmotiv (Tat: *twin arginine translocation*), mit der Konsensussequenz [RRxFx(L)K]. Cofaktorhaltige Enzyme werden mit dem Tat-System durch die Zytoplasmamembran in das Periplasma transportiert (Berks *et al.* 2000, Berks *et al.* 2005). Während des Transportes wird vom Vorläuferprotein (prePceA) das Signalpeptid abgespalten und das vollständig prozessierte Enzym (matPceA) entsteht. Die aus der Aminosäuresequenz berechneten molekularen Massen, liegen im Fall von *S. multivorans* bei 53 kDa (matPceA) und 56 kDa (prePceA) (Neumann *et al.* 1996, Neumann *et al.* 1998). Diese können nach Trennung über SDS-PAGE mittels Immunoblot unterschieden werden. Zusätzlich waren Lokalisationsstudien mittels Gefrierbruch-Replika-Immunogold-Markierungstechnik möglich. Auf Grund dessen konnte eine substratabhängige Lokalisation der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* festgestellt werden. In Anwesenheit von PCE wurde überwiegend matPceA nachgewiesen, welches zum großen Teil im Periplasma lokalisiert war. Im Gegensatz dazu konnte in Abwesenheit von PCE größtenteils prePceA, lokalisiert im Zytoplasma, nachgewiesen werden (John *et al.* 2006). Die Gene der reduktiven Dehalogenasen sind in einem Operon organisiert, dass aus mindestens zwei ORFs besteht. Dabei kodiert ein Gen für die katalytische Untereinheit (*pceA*, *cprA*) und das zweite für ein mutmaßliches Membranankerprotein (*pceB*, *cprB*). Eine Kotranskription beider Gene konnte bisher bei *S. multivorans* (Neumann *et al.* 1998), *D. dehalogenans* (Smidt *et al.* 2000), *Desulfitobacterium* Stamm KBC1 (Tsukagoshi *et al.* 2006) sowie *Dehalococcoides* Stamm VS (Vinylchlorid-Reduktase, Müller *et al.* 2004) nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte die Kotranslation von PceA und PceB im Verhältnis von 1:1 in *S. multivorans* gezeigt werden, was auf eine funktionelle Kopplung beider Proteine schließen lässt (Neumann *et al.* 1998, John 2007). Die Organisation des *pceAB*-Operons und dessen Umgebung in *S. multivorans* sind in Abbildung 5 dargestellt. Der Organismus besitzt eine Kopie von *pceAB*, wobei sich beide Gene um vier Nukleotide überlappen. Stromaufwärts von *pceA* befindet sich ein putatives Promotor-Sequenzmotiv (*E. coli*  $\sigma 70$ , -30 -10 Region) sowie stromabwärts von *pceB* eine Erkennungssequenz für einen  $\rho$ -unabhängigen Transkriptionsabbruch (Neumann *et al.* 1998). In unmittelbarer Nähe stromaufwärts von *pceA* befindet sich ein offener Leserahmen für ein nicht identifiziertes

Protein und drei Gene (*ribA*, *ribB*, *ribH*) für die Riboflavin Biosynthese. Nach dem derzeitigen Wissensstand besitzt *S. multivorans* eine PCE-Dehalogenase.



**Abbildung 5. Lokalisation und Organisation des Operons für *pceAB* und seiner Umgebung in *S. multivorans***

Dargestellt ist die Lage des *pceAB*-Operon mit Promotormotiv (-35 -10,  $\sigma 70$ ) und Terminator ( $\rho$ -unabhängig) sowie weitere *orfs* stromaufwärts in einem 6 kb großem *EcoRI*-Fragment aus der genomischen DNA von *S. multivorans* mit Positionsangaben in bp. Bezeichnung der Gene: ***ribA***: GTP Cyclohydrolase II (unvollständig), ***ribB***: 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat Synthase, ***ribH***:  $\beta$ -Untereinheit der Riboflavin Synthase, ***orf1***: unbekannt, ***pceA***: PCE-Dehalogenase, ***pceB***: mutmaßlicher Membrananker von PceA (nach Neumann *et al.* 1998, Genbank Nummer: AF022812)

Der Kenntnisstand über den Aufbau der Atmungskette der Organohalid-Respiration in *S. multivorans* ist bisher unvollständig. Das gilt insbesondere für die Elektronenübertragenden Komponenten. Formiat-Dehydrogenase und Hydrogenase oxidieren die Elektronendonoren und geben die Elektronen wahrscheinlich an ein membrangebundenes Cytochrom *b* ab (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995, Schmitz & Diekert 2004). An der weiteren Übertragung von Elektronen zur PCE-Dehalogenase könnten Menachinone beteiligt sein (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995, Schmitz & Diekert 2004, Krauter 2006). Weiterhin wird diskutiert, dass die Elektronen auf die Fe/S-Zentren und schließlich auf den Corrinoid-Cofaktor der PCE-Dehalogenase übertragen werden. (Miller *et al.* 1997). Dabei besitzt das Cob(I)/Cob(II)-Redoxpaar des enzymgebundenen Cofaktors ein Redoxpotential bei pH 7,0 von -380 mV (Siebert 2002). Weiterhin wird die Beteiligung eines revertierten Elektronentransports, bei dem ein Elektron mit einem Proton über die Membran ins Cytoplasma transportiert wird, angenommen (Miller *et al.* 1997). Daraus resultiert eine geringere ATP-Ausbeute, die mit gemessenen Wachstumsausbeuten übereinstimmt (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995).

## 1.7. Regulation der Dehalogenasen

Im Gegensatz zur biochemischen Charakterisierung ist der Kenntnisstand über die Regulation der Dehalogenasen noch lückenhaft. Smidt *et al.* (2000) konnten mit ihrer Forschungsarbeit zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der *ortho*-Chlorophenol-

Dehalogenase bei *D. dehalogenans* beitragen. Zusätzlich zum Dehalogenase- (CprA) und putativen Membranankerprotein-Gen (CprB) befinden sich im Operon sechs weitere Gene (*cprTKZEBACD*). Weiterhin konnte die Kotranskription der Gene *cprBACD* und *cprKZ* gezeigt werden. Mögliche Funktionen der Proteine des Operons wurden durch Datenbankvergleiche zugeordnet. Das Protein CprC zeigte Ähnlichkeiten zu dem membrangebundenen Transkriptionsregulator des NosR/NirI-Typs als Regulator der Transkription der N<sub>2</sub>O- und Nitritreduktase (Cuypers *et al.* 1992, Saunders *et al.* 1999, Smidt *et al.* 2000). Die Genprodukte CprD, CprE und CprT sind vermutlich an der Proteinfaltung als Chaperone des GroEL-Typs (CprD, CprE) sowie mit Ähnlichkeit zu einer Peptidyl-Prolyl-Isomerase als Triggerfaktor (CprT) beteiligt (Fink 1999, Smidt *et al.* 2000). Die Regulation der *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase in *D. dehalogenans* erfolgt durch den redox-sensitiven Transkriptionsfaktor CprK (Smidt *et al.* 1999). Neben dem Redoxzustand der Zellen kann die Aktivität der reduktiven Dehalogenasen durch halogenierte oder nicht halogenierte Verbindungen induziert oder reprimiert werden (Smidt & de Vos 2004). Beispielsweise erfolgt die Expression der PCE reduktiven Dehalogenase (PrdA) in *Desulfitobacterium* Stamm KBC1 ausschließlich in Anwesenheit von PCE, welches vermutlich an das Regulatorprotein PrdK bindet (Tsukagoshi *et al.* 2006). Eine Inhibition der Aryldehalogenase durch Sulfit und Thiosulfat ist bei *Desulfomonile tiedjei* beobachtet worden (Townsend *et al.* 1997). Ursprünglich ist man von konstitutiver Expression der PCE reduktiven Dehalogenase in *S. multivorans*, auch in Abwesenheit ihrer Substrate, ausgegangen (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995, Neumann *et al.* 1995). In Langzeitkultivierungen in Abwesenheit von PCE wurde der Organismus kontinuierlich auf frisches Pyruvat- und Fumarat-haltiges Medium überimpft (10 % Inokulum) und dabei entsprach jeder Transfer einer Subkultur. In solchen Versuchen konnte nach 35 Subkultivierungen ein vollständiger Verlust der Aktivität und der Biosynthese der PCE-Dehalogenase sowie Expression von *pceA* gezeigt werden (John & Rubick *et al.* 2009). In den dadurch gewonnen Dehalogenase-negativen (PceA<sup>-</sup>) Kulturen konnte weiterhin das *pceA* Gen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte in solchen Kulturen die Induktion der PCE-Dehalogenase in Anwesenheit von PCE und TCE gezeigt werden (John & Rubick *et al.* 2009). Die Mechanismen dieser neuartigen Langzeitregulation sind bisher ungeklärt. Auch bei einer andauernden Kultivierung von *D. hafniense* Stamm Y51 und Stamm PCE-S in Anwesenheit von cDCE, TCE oder Fumarat als Elektronenakzeptor und Pyruvat als Elektronendonator kommt es zum Verlust der PCE-Dehalogenase-Aktivität. Bei diesem

Organismus konnten diese Beobachtungen ebenfalls erst nach 40 bis 70 Subkultivierungen festgestellt werden (Reinhold 2008). Als Ursache für die Abnahme der Enzymaktivität wird eine Steigerung der Deletionsrate des Transposons bzw. Promotors im Operon von *pceA* angenommen (Furukawa *et al.* 2005, Futagami *et al.* 2006).

### 1.8. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss ausgewählter Umweltfaktoren auf die Organohalid-Respiration in *Sulfurospirillum multivorans* betrachtet werden. Ein durch halogenierte Verbindungen kontaminierter Aquifer ist durch die Bildung eines Redoxgradienten innerhalb der Verschmutzungsfahne geprägt. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Redoxpotentiale im Kultivierungsmedium auf den Abbau von PCE und das Wachstum von *S. multivorans* untersucht. Im Hinblick auf das niedrige Redoxpotential bei pH 7,0 von -380 mV des Cobalamin(II)/Cobalamin(I)-Paares des Cofaktors der PCE-Dehalogenase sollten Einflüsse von positiveren Redoxpotentialen auf Dechlorierung und Wachstum in dem den Zellen umgebenden Medium untersucht werden. Vorerst musste ein geeignetes System zur Veränderung und Einstellung des Redoxpotentials eruiert werden. Zur Überprüfung standen die Eignung der Verwendung von redoxaktiven Chemikalien bzw. Mediatoren sowie die Veränderung des Redoxpotentials durch ein Elektrodensystem.

Weiterhin standen Untersuchungen im Mittelpunkt, die kompetitive Effekte von PCE und Sauerstoff sowie die alternativen Elektronenakzeptoren Fumarat und Nitrat auf den Energiestoffwechsel überprüfen sollten. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob durch Sauerstoff nur die Organohalid-Respiration oder auch andere Energiestoffwechselwege beeinflusst werden.

Die bereits gewonnen Erkenntnisse über die Langzeitregulation der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* sollten weiter vertieft werden. Zum einen war die Frage zu klären, ob bei weiteren Wachstumssubstraten in Abwesenheit von PCE die Biosynthese und Expression des Enzymes erst nach einem langen Zeitraum der Kultivierung eingestellt wird. Zum anderen sollten Erkenntnisse über die Regulation der PCE-Dehalogenase gewonnen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Organismen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bakterien *Sulfurospirillum multivorans* (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995) Typstamm 12446<sup>T</sup> (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig) und *Sulfurospirillum halorespirans* (Luijten *et al.* 2003) Typstamm 13726<sup>T</sup> (DSMZ, Braunschweig) verwendet. Weiterhin wurden die Bakterien *Escherichia coli* K12 und *Pseudomonas syringae* genutzt.

### 2.2. Kultivierung

Die Kultivierung von *S. multivorans* und *S. halorespirans* erfolgte bei 28 °C auf anaerobem Mineralmedium, dem verschiedene Substrate als Energie- und Kohlenstoffquelle zugesetzt wurden (Neumann *et al.* 1994, Scholz-Muramatsu *et al.* 1995). Das Stammmedium setzte sich aus verschiedenen Lösungen zusammen, deren Zusammensetzung und Herstellung im Folgenden aufgeführt werden. Das Basalmedium enthielt je Liter 0,2 % (m/V) Hefeextrakt; 0,07 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,25 g NH<sub>4</sub>Cl; 1,0 g NaCl; 0,4 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,5 g KCl; 0,15 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, des Weiteren 10 ml Supplementlösung; 40 ml 1 M NaHCO<sub>3</sub>; 1 ml 5 % (m/V) Cysteinhydrochlorid; 2,5 ml 36 mM FeSO<sub>4</sub> (in 50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sowie die benötigten Substrate. Die Supplementlösung bestand aus Vitaminen und Spurenelementen mit folgender Zusammensetzung: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 enthielt je Liter 1,6 mM HCl und als Spurenelemente 0,1 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 7 mg ZnCl<sub>2</sub>; 10 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0,6 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 13 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,2 mg CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 2,4 mg NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 3,6 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,26 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0,66 mg Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> sowie 5 mg Cyanocobalamin; 4 mg *p*-Aminobenzoessäure; 1 mg Biotin; 10 mg Nikotinsäure; 5 mg Calciumpantothenat; 15 mg Pyridoxamin·2HCl und 10 mg Thiamin·HCl.

Das Basalmedium wurde anaerobisiert, autoklaviert und anschließend mit steriler FeSO<sub>4</sub>- und Cysteinlösung, NaHCO<sub>3</sub> sowie der Supplementlösung komplettiert. Die Medien wurden mit 10 % (V/V) einer gewachsenen Vorkultur beimpft.

Als Substrate wurden Formiat, Pyruvat, Fumarat und Nitrat in Konzentrationen von 20, 40 und 80 mM verwendet (siehe Tabelle 1). Wenn Formiat als Energiequelle verwendet wurde, enthielt das Medium 5 mM Acetat als Kohlenstoffquelle.

Von den chlorierten Ethenen (cDCE, TCE, PCE) wurde eine 0,5 M Stammlösung, gelöst in Hexadecan, hergestellt. Sofern nicht anders angegeben, wurden 50 ml Medium 1 ml PCE-



Stammlösung, 0,5 ml TCE-Stammlösung oder 0,25 ml DCE-Stammlösung zugesetzt. Die Verteilung der Ethene in Flüssig-, Gas- und Hexadecan-Phase wurde mit der Henry Konstante berechnet. Diese beträgt für PCE, TCE, und cDCE jeweils 0,92; 0,5; und 0,19 (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995).

**Tabelle 1. Verwendete Substratkombination und entsprechende Konzentrationsangaben (in mM) für die Langzeitkultivierung von *S. multivorans* und *S. haloalkaliphilus***

	Nr.	Pyr	Fum	For	Nit	O <sub>2</sub>	PCE	TCE	cDCE
	I	40	40	-	-	-	-	-	-
	II	40	80	-	-	-	-	-	-
	III	40	40	-	-	-	10	-	-
	IV	40	80	-	-	-	10	-	-
	V	40	40	-	-	-	-	5	-
	VI	40	40	-	-	-	-	-	2,5
<i>S. m.</i>	VII <sup>1</sup>	40	40	-	-	-	-	-	-
	VIII	40	-	-	-	10 <sup>2</sup>	-	-	-
	IX	40	-	-	20	-	-	-	-
	X	40	-	-	-	-	10	-	-
	XI	-	40	-	-	-	-	-	-
	XII	-	40	-	-	-	10	-	-
	XIII	-	20	20 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
<i>S. h.</i>	XIV	20	20	-	-	-	-	-	-

Abkürzungen: Pyr (Pyruvat), Fum (Fumarat), For (Formiat), Nit (Nitrat), - im Medium nicht enthalten

<sup>1</sup> ohne Hefeextrakt und Vitamin B<sub>12</sub>

<sup>2</sup> Angaben beziehen sich auf % im Gasraum der Kultivierungsflaschen

<sup>3</sup> bei Formiat wurden zusätzlich 5 mM Acetat zugesetzt

*S. m.*: *S. multivorans*; *S. h.*: *S. haloalkaliphilus*

### Stammhaltung und Konservierung

Die Stammhaltung von *S. multivorans* und *S. haloalkaliphilus* erfolgte mit 40 mM Formiat, 5 mM Acetat und 10 mM Tetrachlorethen. Zur langfristigen Konservierung der Bakterienstämme wurden anaerobe Glycerinkulturen verwendet, die bei -80 °C gelagert wurden. Diese enthielten 550 µl 87 % (V/V) Glycerin, 5 % (m/V) Cystein und 5 % (m/V) Na<sub>2</sub>S·H<sub>2</sub>O sowie 5 ml Kultur und wurden durch Teflonsepten verschlossen.

### *Escherichia coli* und *Pseudomonas syringae*

Die Stammhaltung von *E. coli* und *P. syringae* erfolgte auf LB-Agarplatten (5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl, 15 g Agar jeweils pro Liter). *E. coli* wurde zusätzlich auf flüssigem Mineralmedium gezüchtet, welches sich wie folgt zusammensetzte: 10 ml Lösung A, 40 ml Lösung B, 1 ml Spurenelementlösung, 2 g Glucose und 2 g Hefeextrakt (pro Liter Medium). Ein Liter der Lösung A enthielt: 9 g NaCl, 18 g NH<sub>4</sub>Cl, 18 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g

Ammonium Eisen(III)-Citrat und  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Zur Herstellung eines Liters der Lösung B wurden 35 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 350 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  benötigt. Ein Liter Spurenelementlösung setzte sich aus 0,1 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,3 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,2 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  und 0,03 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  zusammen. Die Glucose wurde als 10fache Stammlösung vom Medium getrennt autoklaviert und anschließend zum Medium hinzugefügt.

### 2.2.1. Langzeitkultivierung

Die Langzeitkultivierung von *Sulfurospirillum* spp. erfolgte auf verschiedenen Kombinationen der Energiesubstraten, die in Tabelle 1 aufgelistet sind. Als Vorkultur diente jeweils eine frische Kultur aus der Stammhaltung mit Formiat/PCE. Die Kulturen wurden kontinuierlich in der späten logarithmischen Wachstumsphase auf frisches Medium mit 10 % Inokulum überimpft. Eine einzelne angewachsene Kultur entspricht dabei einer Subkultur, die jeweils 3-4 Generationen entsprach.

### 2.2.2. Kultivierung in kleinem Maßstab

Versuche mit wachsenden Kulturen wurden unter anoxischen Bedingungen (anaerobisierte Medien und  $\text{O}_2$ -freie Gasphase) bei 28 °C unter ständigem Schütteln ( $130 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ) durchgeführt. Die Serum- bzw. Schottflaschen enthielten dabei Medium von der Hälfte des Gesamtvolumens der Flaschen. Die Hauptkulturen wurden 10%ig von einer auf dem gleichen Substrat gewachsenen Vorkultur angeimpft.

### 2.2.3. Kultivierung im Fermenter

Zur kontinuierlichen Aufzeichnung des Redoxpotentials in wachsenden Kulturen wurden diese in einem 2 l-Fermenter kultiviert. Das Fermentergefäß wurde mit Medium befüllt und mittels Durchgasen mit  $\text{N}_2$  anaerobisiert. Der Fermenter war mit einer Fermenter-Steuereinheit (Biostat® B, Braun Biotech International, Melsungen), Rührwerk, Redoxelektrode (Pt4805-DPAS-SC-K8S/225, Mettler Toledo, Giessen), pH-Elektrode und einer Temperatursonde ausgestattet. Die Versuche wurden durch 10%iges Animpfen gestartet. Die Fermenter-Kontrolleinheit regulierte die Kultivierungstemperatur (28 °C) sowie den pH-Wert (7,3) durch Titrieren mit 1 N NaOH und 5 % (V/V)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Alle nicht autoklavierbaren Teile wurden vor Verwendung mit 1 % (V/V) Peressigsäure desinfiziert.

#### **2.2.4. Wachstum mit Sauerstoff**

Für die Kultivierung in Anwesenheit von Sauerstoff wurden die Versuchsgefäße zur Hälfte mit Medium befüllt und vollständig anaerobisiert. Nach dem Autoklavieren wurde der Gasraum nach Evakuieren, mit einem entsprechenden Volumenanteil O<sub>2</sub> versetzt und mit N<sub>2</sub> aufgefüllt. Zur routinemäßigen Kultivierung wurden 10 % (V/V) O<sub>2</sub> im Gasraum eingesetzt, was einem Volumenverhältnis von 50 % (V/V) sterile Luft und 50 % (V/V) N<sub>2</sub> entspricht. Einige Versuche erfolgten unter Verwendung unterschiedlicher Volumina des Mediums, wobei der Gasraum durch 100 % sterile Luft ersetzt wurde. Um eine Sättigung des Mediums mit Sauerstoff zu gewährleisten, wurden die Kulturen auf einem Schüttelwasserbad (1092, GFL, Burgwedel) inkubiert (28 °C, 170 U·min<sup>-1</sup>).

#### **2.2.5. Gewinnung von Einzelkolonien**

Zur Gewinnung von Einzelkolonien wurde eine gewachsene Kultur steril verdünnt, die Verdünnung auf anaerobe Rolltubes (40 mM Pyruvat, 40 mM Fumarat, 3 % (m/V) Agar) aufgebracht und bei 28 °C inkubiert. Es wurden einzelne Kolonien in 5 ml Pyruvat-Fumarat-Flüssigmedium in Reagenzröhrchen transferiert. Es folgte eine weitere Überimpfung in Flüssigmedium mit einem größeren Volumen (25 ml). Das Anerobisieren der Röhrchen erfolgte mittels sterilen Wattestopfen, die mit 400 µl 10 % (m/V) Pyrogallol und 600 µl 62,5 % (m/V) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt waren. Diese wurden in den Gasraum der Reagenzröhrchen eingebracht, die anschließend verschlossen wurden.

#### **2.2.6. Ruhende Zellen**

Der Einsatz von ruhenden Zellen ermöglicht die Untersuchungen von Einflüssen auf den Energiestoffwechsel eines Organismus, da der Baustoffwechsel nicht aktiv ist. Dafür wurde ein Zellsuspensionspuffer verwendet, der aus 100 mM Tris·HCl pH 7,5 versetzt mit 100 mM KCl, 250 mM Saccharose und 0,4 mM Cystein·HCl, bestand. Zunächst erfolgte die Herstellung einer Zellsuspension, mit der die Versuchsflaschen angeimpft wurden. Durch Zentrifugieren bei 4000 x g für 15 min wurden die Zellen einer 1 l-Vorkultur geerntet. Das Zellsediment wurde mit Zellsuspensionspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellen im Puffer und Bestimmung der Zelldichte. Die Versuche wurden durch Zugaben der Zellsuspensionen zum Zellsuspensionspuffer gestartet und erfolgten mit definierten Zelldichten.

### **2.2.7. Bestimmung von Zelldichte, pH-Wert und Redoxpotential**

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch photometrische Messung der optischen Dichte ( $OD_{578}$ ) bei 578 nm (Pharmacia Biotech Novaspec II, Uppsala, Schweden). Das im Medium befindliche Resazurin wurde vor der Messung durch Zugabe von Natriumdithionit bis zum farblosen Zustand reduziert.

Der pH-Wert in Lösungen und Medien wurde mit einer pH-Elektrode (InLab®, Mettler Toledo, Giessen) und einem pH-Meter (WTW 340, WTW, Weilheim) bestimmt.

Die Messung des Redoxpotentials in Medium und Pufferlösungen erfolgte mit einer Redoxelektrode (Pt4800-M5-S7, Mettler Toledo, Giessen) an einem pH-Meter. Um einen störenden Einfluss von Sauerstoff zu minimieren, wurden die Redoxpotential-Messungen in der Anaerobenkammer (COY Laboratory, Grass Lake, Michigan, USA) unter Schutzatmosphäre (95 %  $N_2$ /5 %  $H_2$ ) durchgeführt. Weiterhin kam eine Redoxelektrode (Pt4805-DPAS-SC-K8S/225, Mettler Toledo, Giessen) zur Verwendung, die an einem Fermenter-Steuergerät (DCU, Braun Biotech International, Melsungen) angeschlossen wurde.

## **2.3. Analytische Methoden**

### **2.3.1. Fumarat- und Pyruvatbestimmung**

Die quantitative Bestimmung von Fumarat und Pyruvat wurde mit einem HPLC-System (Merck Hitachi, Darmstadt) mit einer RP8-Säule (LiChrosphere® 100; ID 4,6 x 100 mm; Merck, Darmstadt) bei einer Detektorwellenlänge von 210 nm bestimmt. Als Laufmittel diente 0,3 % (V/V)  $H_3PO_4$  mit einer Flussrate von  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Die Proben wurden vor der Analyse bei  $13.200 \times g$  zentrifugiert und nach Verdünnung des Überstandes wurden 10  $\mu\text{l}$  in die HPLC injiziert. Die Standard-Konzentrationen lagen zwischen 0 und 1 mM Fumarat sowie zwischen 0 und 2 mM Pyruvat. Die Retentionszeiten lagen für Fumarat bei 4,7 min sowie für Pyruvat bei 2,9 min und 3,3 min. Die Flächen beider Pyruvat-Peaks wurden zur Auswertung addiert.

### **2.3.2. Acetatbestimmung**

Die Acetatbestimmung wurde enzymatisch nach der Methode von Holz & Bergmeyer (1970) durchgeführt. In diesem Test phosphoryliert die Acetatskinase Acetat zu Acetylphosphat, welches mit Hydroxylamin zu Acethydroxamsäure reagiert. In saurem Milieu bildet die

Enolform mit Eisen(III)-chlorid einen roten Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 492 nm.

Der Nachweis wurde in zwei Schritten durchgeführt. Die notwendigen Reagenzien und Arbeitsschritte sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Messung erfolgte in Mikrotiterplatten bei  $\lambda = 492$  nm (150  $\mu$ l pro Kavität) mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (VERSAmax™ Microplate Reader, Molecular Devices, Ismaning).

**Tabelle 2. Reagenzien und Arbeitsschritte für die Acetatbestimmung.** Zugabe erfolgte in der angegebenen Reihenfolge

$\mu$ l im Test		Zusammensetzung der Reagenz
Schritt I	50	Puffer: 100 mM Triethanolaminhydrochlorid, 20 mM $\text{MgCl}_2$ pH 7,4
	20	4 M Hydroxylamin-hydrochlorid (kurz vor Anwendung mit gleicher Menge 4 N NaOH neutralisiert)
	20	84 mM ATP in 5 % $\text{NaHCO}_3$
	10	Probe/Standard Standard: 10 mM Natriumacetat
	1,4	Acetatkinase (250 U/mg, 5 mg/ml, 1250 U/ml aus <i>E. coli</i> (Roche, Mannheim)
	Inkubation für 30 min bei 35 °C	
Schritt II	100	600 mM Trichloressigsäure
	400	60 mM Eisen(III)-chlorid in 1,2 M HCl
	Zentrifugation für 1 min bei 13200 x g, Messung des Überstandes	

### 2.3.3. Bestimmung der Lactatkonzentration

Die Lactatbestimmung wurde mittels einer modifizierten Methode nach Babson & Babson (1973) durchgeführt. Lactat wird durch die Lactat-Dehydrogenase zu Pyruvat oxidiert unter gleichzeitiger Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu NADH. Das chemische Gleichgewicht der Reaktion liegt jedoch auf der Seite des Lactats. Aus diesem Grund wurden dem Messansatz Phenazinmethosulfat (PMS) und 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zugesetzt, was zu einer Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  führt. In diesem Fall wird die Oxidation von Lactat zu Pyruvat begünstigt.

Der Messansatz setzte sich wie folgt zusammen: 800  $\mu$ l Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,2), 50  $\mu$ l MTT (8,4 mM), 50  $\mu$ l PMS (33,2 mM), 100  $\mu$ l Probe/Standard und 10  $\mu$ l  $\text{NAD}^+$  (50 mM).

Die Messung wurde mit Zugabe von 10 µl Lactat-Dehydrogenase (1:50 verdünnt, 960 U/mg, Sigma-Aldrich, München) gestartet und die Absorption bei 570 nm verfolgt.

### 2.3.4. Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumbestimmung

#### Ammonium

Zur Bestimmung von Ammonium wurde ein kolorimetrischer Ammoniumtest (Aquaquant®, Merck, Darmstadt) verwendet. Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass nach Alkalisierung der Proben Ammoniak mit Hypochlorit zu Monochloramin reagiert. Dieses wiederum reagiert in einer Zweistufenreaktion mit Thymol zu Indophenol, welches über die Absorption bei 690 nm nachgewiesen wird.

Für die Durchführung wurde das Protokoll des Herstellers modifiziert. Im ersten Schritt wurden 500 µl Probe/Standard mit 60 µl Lösung NH<sub>4</sub>-1B (gebrauchsfertig) und 50 µl Lösung NH<sub>4</sub>-2B (75 mg Pulver in 500 µl Wasser) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von 6 µl der Lösung NH<sub>4</sub>-3B (gebrauchsfertig) und eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Abschließend wurden 150 µl der Ansätze in eine Mikrotiterplatte pipettiert und bei  $\lambda = 690$  nm gemessen. Als Standard kam NH<sub>4</sub>Cl in Konzentrationen zwischen 0 und 500 µM zur Anwendung.

#### Nitrat

Zur Messung der Nitratkonzentrationen nach der Methode von Velghe & Claeys (1985) wurden 0,5 ml Probe und 25 µl 5 % (m/V) Resorzinol gemischt. Nach Zugabe von 0,65 ml konzentrierter Schwefelsäure (36 N) erfolgte die Messung der Extinktion bei  $\lambda = 360$  nm. Als Standard dienten NaNO<sub>3</sub>-Lösungen in Konzentrationen zwischen 0 und 0,5 mM.

#### Nitrit

Die Nitritbestimmung erfolgte nach der Methode von Afkhami *et al.* 2004. Vorhandenes Nitrit reagiert im sauren Milieu mit *p*-Nitroanilin zu einem aromatischen Diazonium-Amin, welches mit Diphenylenamin zu einem Azo-Produkt reagiert (Abbildung 6). Durch Zusatz von Triton® X-100 im Reaktionsansatz ist der Azo-Farbstoff wasserlöslich und dessen Bildung kann photometrisch bei 500 nm verfolgt werden. Mit dieser Methode können Nitritkonzentrationen zwischen 1 µM und 10 µM bestimmt werden.

Probe oder Standard

2 ml 5 M Schwefelsäure

1 ml 14 % (V/V) Triton® X-100

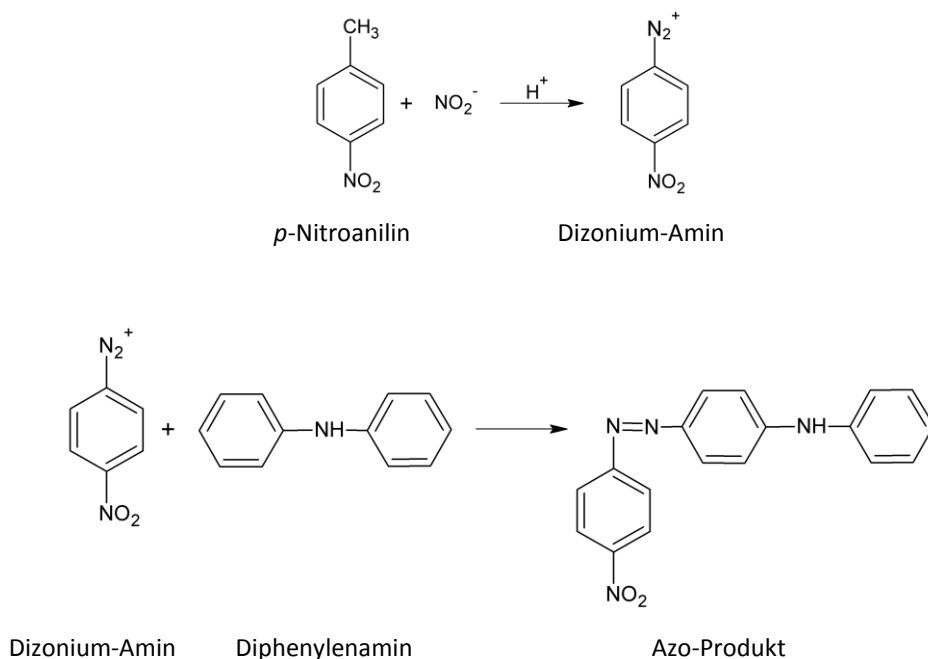
1 ml 0,2 % (m/V) *p*-Nitroanilin

ad 9 ml deionisiertes Wasser

1 ml 0,5 % (m/V) Diphenylenamin

Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur

Absorptionsmessung bei  $\lambda = 500 \text{ nm}$



**Abbildung 6. Reaktionsschema der Nitritbestimmung (Afkhami *et al.* 2004)**

### 2.3.5. Konzentrationsbestimmung von Nicotinamidadenindinukleotiden

Die Bestimmung des Gehaltes an Nicotinamidadenindinukleotiden ( $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$ ) erfolgte nach der Methode von Snoep *et al.* 1990. Die Extraktion von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  aus den Zellen wurde bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Der Extraktionspuffer bestand aus 100 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP), der mit HCl auf pH 1,5 (für  $\text{NAD}^+$ -Extraktionspuffer) bzw. mit KOH auf pH 11,5 ( $\text{NADH}$ -Extraktionspuffer) eingestellt wurde. Der Zellaufschluss erfolgte direkt im jeweiligen Extraktionspuffer durch 10-minütiges Erhitzen auf 95 °C. Die Proben wurden auf Eis gekühlt für 20 min mit 1 mg DNase inkubiert. Danach erfolgte das Abtrennen der Zellreste durch Zentrifugation (5 min, 16.000 x g, Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde der pH-Wert in den Proben

auf 7 eingestellt. Bei der  $\text{NAD}^+$ -Extraktion erfolgte die schrittweise Zugabe von NaOH bis zu einem pH-Wert von 6,5. In den NADH-Proben wurde mit HCl ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Die Konzentrationsbestimmung von  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  erfolgte indirekt in einem photometrischen Test mit Hilfe der Alkohol-Dehydrogenase (ADH). Diese katalysiert die Reaktion von Ethanol und  $\text{NAD}^+$  zu Acetaldehyd und  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und deren Rückreaktion. NADH wiederum reduziert PMS und dieses reduziert anschließend MTT. Durch die Reduktion des MTT wird ein Formazan mit einem Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 570 \text{ nm}$  gebildet. Der Messansatz enthielt folgende Bestandteile: 500  $\mu\text{l}$  Probe; 50  $\mu\text{l}$  8,4 mM MTT; 50  $\mu\text{l}$  33,2 mM PMS; 10  $\mu\text{l}$  96 % Ethanol; 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  ADH (900 U/ml) gestartet und bei 35 °C für 20 min verfolgt. Die Berechnung der  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Konzentrationen in den Proben erfolgte anhand von erstellten Kalibriergeraden mit Standards zwischen 0,5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  bzw. NADH.

### **2.3.6. Gase und andere flüchtige Verbindungen**

Die Bestimmung der Konzentrationen der flüchtigen Verbindungen PCE, TCE und cDCE wurde mit einem Gaschromatograph, ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor, durchgeführt (Neumann *et al.* 1994). Die Konzentrationsbestimmung der Gase  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  erfolgte mittels Gaschromatographie mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) in der Arbeitsgruppe von Prof. Küsel am Lehrstuhl für Limnologie, Institut für Ökologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Für die Bestimmung der Konzentrationen der chlorierten Verbindungen wurde der Kultur 1 ml Flüssigkeit entnommen und in ein mit einem Teflonseptum verschlossenes Probengefäß überführt. Die Organismen wurden durch Erhitzen auf 95 °C abgetötet. Als interner Standard wurden der Probe vor der Messung 200  $\mu\text{M}$  Nonan (aus 10 mM Stammlösung in Hexadecan) zugesetzt. Nach einer Inkubation für 6 min bei 95 °C wurden 250  $\mu\text{l}$  aus der Gasphase entnommen und in den Gaschromatographen injiziert. Die Konzentrationen der chlorierten Ethene wurden mittels vorher gemessener Standards berechnet, die der gleichen Behandlung unterzogen wurden.

Die Konzentrationsbestimmung von  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2$  erfolgte nach Küsel & Drake (1995). Die Probenentnahme erfolgte mit sterilen Spritzen und Kanülen aus dem Gasraum des Versuchsansatzes. Zur Messung des Innendrucks im Versuchsgefäß kam ein Nadelmanometer (DMG 2120, DMG, Horgen, Schweiz) zur Anwendung. Unter Verwendung



von externen Standards sowie Einbeziehung von Raumtemperatur, aktuellem Luftdruck, Innendruck, Flüssigkeitsvolumen und Gasvolumen wurden die Gasmengen im Probengefäß berechnet. Die verwendeten Parameter der Gaschromatographen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3. Parameter der Analysen von chlorierten Ethenen, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> mittels Gaschromatographie**

Verbindung	PCE, TCE, cDCE	O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
<b>Gerätetyp</b>	Chrompack CP 9000 (Frankfurt)	Hewlett-Packard Co. 5980 Series II (Palo Alto, USA)	
<b>Detektor</b>	Flammenionisationsdetektor (FID)	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)	
<b>Säule</b>	10 % Ucon LB /WAW, 2 m x 2 mm (Werner Günther Analystechnik, Moers)	Molekularsieb, 2 m x 1/8" (Alltech, Unterhaching)	Chromosorb 102, 2 m x 1/8" (Alltech, Unterhaching)
<b>Trärgas</b>	Stickstoff	Argon	Helium
<b>Flussrate</b>	30 ml·min <sup>-1</sup>	33 ml·min <sup>-1</sup>	15 ml·min <sup>-1</sup>
<b>Injektortemperatur</b>	150 °C	150 °C	150 °C
<b>Detektortemperatur</b>	250 °C	175 °C	175 °C
<b>Ofentemperatur</b>	80 °C	50 °C	40 °C
<b>Injektionsvolumen</b>	250 µl	100 µl	100 µl
<b>Retentionszeiten</b>	cDCE: 1,0 min TCE: 1,3 min PCE: 2,0 min Nonan: 2,3 min	H <sub>2</sub> : 0,5 min O <sub>2</sub> : 0,9 min	CO <sub>2</sub> : 1,8 min

### 2.3.7. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach einer modifizierten Methode von Bradford (1976). Für die Messung wurden zu 50 µl Probe beziehungsweise Standard (0 – 100 µg/ml Rinderserumalbumin) 200 µl Nachweisreagenz (1:5 verdünnt mit H<sub>2</sub>O, Roti®-Nanoquant, Roth, Karlsruhe) gegeben. Es folgte die Inkubation des Ansatzes für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Quotient der Absorptionen A<sub>590</sub>/A<sub>490</sub> bestimmt, die mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (VERSAmax™ Microplate Reader, Molecular Devices, Ismaning) gemessen wurden.

## 2.4. Enzymaktivitäten

Es wurden die spezifischen Enzymaktivitäten der PCE-Dehalogenase, Fumarat-Reduktase, Nitrat-Reduktase,  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase sowie Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase in Rohextrakten von *S. multivorans* gemessen.

Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten wurden Kulturen in der späten exponentiellen Wachstumsphase bei 12000 x g zentrifugiert und das Zellsediment anaerob in zirka 2 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert. Die Zellen wurden bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor dem Messen der Enzymaktivitäten erfolgte der Zellaufschluss anaerob mittels French® Press (1000 psi, 80 bar, French® Pressure Cell Press, SIM-AMINCO, Spectronic Instruments, New York, USA).

### 2.4.1. PCE-Dehalogenase

Die photometrische Bestimmung der PCE-Dehalogenase-Aktivität im Rohextrakt wurde anaerob bei 25 °C durchgeführt (Neumann *et al.* 1996). Es wurde die Oxidation von reduziertem Methylviologen (MV) mit PCE als Elektronenakzeptor bei 578 nm mit einem Photometer (Cary 300 Bio UV/VIS Spectrophotometer, Varian, Darmstadt) gemessen. Der Test wurde in mit N<sub>2</sub> durchgasten Glasküvetten in Tris-HCl Puffer (100 mM pH 7,5; 4 mM Ammoniumsulfat; 0,5 mM Methylviologen), 0,5 mM PCE und Rohextrakt durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von PCE. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität des Enzymes wurde der molare Extinktionskoeffizient  $MV_{red} \epsilon_{578} = 9,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  verwendet.

### 2.4.2. Fumarat-Reduktase

Die Aktivität der Fumaratreduktase im Rohextrakt von *S. multivorans* wurde in Tris-HCl Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM Benzylviologen) bestimmt (Miller *et al.* 1997). Nach der teilweisen Reduktion von Benzylviologen (BV) mit Titan(III)-citrat wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von Rohextrakt und 1 mM Fumarat gestartet. Der Anstieg der Absorption von BV wurde photometrisch bei 546 nm verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität des Enzymes wurde der molare Extinktionskoeffizient für  $BV_{red} \epsilon_{546} = 19,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  verwendet.

### 2.4.3. Nitrat-Reduktase

Die Aktivität der Nitrat-Reduktase wurde unter anaeroben Bedingungen bei 25 °C nach Kern *et al.* (2007) bestimmt. Es erfolgte die photometrische Messung der Oxidation von Benzylviologen (BV) über die Abnahme der Absorption bei 546 nm. Der Messansatz bestand aus 50 mM KPP pH 7,0; 1 mM BV; 10 mM NaNO<sub>3</sub> und einem Aliquot Rohextrakt aus *S. multivorans*. Bei der Berechnung der spezifischen Enzymaktivität wurde beachtet, dass bei der Reduktion von 1 mol Nitrat zu Nitrit 2 mol BV oxidiert wurden.

### 2.4.4. $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase

Die Bestimmung der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase ( $\alpha$ KGDH) erfolgte nach Gibson *et al.* (1984). Der Messpuffer enthielt 50 mM MOPS (mit 1 M Tris auf pH 7,6 eingestellt), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M EDTA, 0,5 mM DTT, 1 mM NAD<sup>+</sup>, 0,12 mM Coenzym A sowie Rohextrakt. Nach Zugabe von 1 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat wurde die Bildung von NADH bei 340 nm mit einem Photometer verfolgt.

### 2.4.5. Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase

Die Aktivität der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) erfolgte nach der Methode von Miller *et al.* (1997). Der anaerobe Messpuffer enthielt 100 mM Tris·HCl pH 8,0; 10 mM MV; 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,5 mM CoA. Nach Zugabe von Rohextrakt und 10 mM Pyruvat wurde die Reduktion von Methylviologen bei 578 nm verfolgt.

### 2.4.6. Oxidase-Test

Mit dem Oxidase-Test kann das Enzym Cytochrom c-Oxidase in der Atmungskette von Zellen nachgewiesen werden. Der Test wurde nach Kovacs (1956) durchgeführt. Dafür wurde eine Lösung aus 1 mg/ml N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-Phenylendiamin (TMPD) in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (KPP) (pH 7) mit der Bakteriensuspension gemischt. Wenn eine Cytochrom c-Oxidase vorhanden ist, wird diese über das Cytochrom c durch die Farbreagenz reduziert. Das TMPD wird dabei zu einem Radikal-Kation oxidiert und ändert seine Färbung von farblos zu violett. Bei einem Oxidase-positiven Organismus muss die Farbreaktion innerhalb von einer Minute auftreten. Andernfalls wird das Bakterium als Oxidase-negativ eingestuft.

#### **2.4.7. Aktivitäten O<sub>2</sub>-entgiftender Enzyme**

##### **Katalase**

Die Bestimmung der Katalaseaktivität erfolgte nach der modifizierten Methode von Beers & Sizer (1952). Die Reaktion wurde nach Zugabe von Rohextrakt zum Messansatz (50 mM KPP pH 7,0; 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gestartet und der Verbrauch von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 240 nm verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität wurde der molare Extinktionskoeffizient von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  verwendet.

##### **NADPH-Peroxidase**

Die Durchführung zur Bestimmung der Aktivität der Peroxidase erfolgte nach van Niel & Gottschal (1998). Die Oxidation von NADPH wurde photometrisch bei 340 nm unter anaeroben Bedingungen verfolgt. Der Testpuffer bestand aus 50 mM KPP pH 7,0 und 0,4 mM NADPH. Die Reaktion wurde nach Zugabe von Rohextrakt und 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet. Der zur Berechnung der spezifischen Aktivität verwendete molare Extinktionskoeffizient lag bei  $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

##### **Superoxid-Dismutase (SOD)**

Die SOD-Aktivität wurde nach der Methode von McCord & Fridovich (1969) unter Zuhilfenahme des Xanthin-Oxidase/Cytochrom c-Systems bestimmt. Die Aktivitätsmessung wurde in mehreren Schritten durchgeführt (Abbildung 7). Im ersten Schritt wurde die Extinktionszunahme bei 550 nm, als Resultat der Reduktion von Cytochrom c durch die Xanthin-Oxidase (XOD), verfolgt (Abbildung 7, A und C). Dafür wurden dem Messansatz (50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8,0; 56 mU/ml XOD; 0,1 mM Xanthin) 0,025 % (m/V) Cytochrom c zugesetzt. In einem zweiten Schritt wurde die SOD-Aktivität indirekt mit folgendem Messpuffer gemessen: 50 mM NaPP pH 8,0; 56 mU/ml XOD; 0,025 % (m/V) Cytochrom c sowie Rohextrakt (Abbildung 7, A-C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 mM Xanthin gestartet und photometrisch bei 550 nm verfolgt. Abschließend wurde die Differenz der Extinktionszunahmen des ersten und zweiten Messschrittes gebildet. Die Berechnung der spezifischen SOD-Aktivität erfolgte mit dem molaren Extinktionskoeffizient von Cytochrom c  $\epsilon_{550} = 19,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

<b>A</b>	Xanthin + O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	→	Harnsäure + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> + H <sup>+</sup>	Xanthin-Oxidase
<b>B</b>	2 O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> + 2 H <sup>+</sup>	→	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + O <sub>2</sub>	SOD
<b>C</b>	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> + Cyt. c <sub>ox</sub>	→	O <sub>2</sub> + Cyt. c <sub>red</sub>	nicht enzymatisch

**Abbildung 7. Reaktionsschritte bei der SOD-Aktivitätsbestimmung**

Die Bestimmung der Aktivität der SOD in Zellextrakten wurde, wie im Text beschrieben, in drei Messschritten (A, B, C), durchgeführt.

## NADH-Oxidase

Zur Bestimmung der Aktivität der NADH-Oxidase nach Kawasaki *et al.* (2005) wurde Messpuffer verwendet, der 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 und 0,4 mM NADH enthielt. Nach Zugabe von Rohextrakt, wurde der Verbrauch an NADH bei 340 nm gemessen. Zusätzlich zur Messung erfolgte die Bestimmung eines anaeroben Blindwertes, der vom aeroben Messwert subtrahiert wurde.

## 2.5. Subzelluläre Fraktionierung

### 2.5.1. Zellfraktionierung

Zur Analyse der exprimierten Proteine in *S. multivorans* wurden die Zellen in lösliche Bestandteile und Membranen fraktioniert. Die Kulturen wurden in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation (12000 x g, 4 °C, 15 min) geerntet. Die Zellen wurden mit Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5) gewaschen und durch French® Press (2000 psi, French® Pressure Cell Press, SIM-AMINCO, Spectronic Instruments, New York) aufgeschlossen. Zellwandreste und andere größere Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 5200 x g (4 °C, 15 min) abgetrennt. Anschließend erfolgte die Fraktionierung des Überstandes durch Ultrazentrifugation (90000 x g, 4 °C, 35 min). Die gewonnen Membranen wurden dreimal in Tris-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (90000 x g, 4 °C, 35 min). Sowohl Membranen als auch lösliche Zellbestandteile wurden bei -80 °C gelagert und zu Proteomanalysen in Trockeneis gebettet an das Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung in Leipzig versendet.

### 2.5.2. Solubilisierung von Membranproteinen

Diese Versuche sowie die zweidimensionale Gelelektrophorese und Massenspektrometrie wurden am Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (UFZ) Leipzig im Department Proteomics bei PD Dr. Martin von Bergen und Dr. Jana Seifert durchgeführt.

Die in der Zellfraktionierung gewonnenen Membranpellets wurden für 1 h bei 4 °C in 10 mg/ml Waschpuffer (50 mM Tris·HCl pH 7,4; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,02 % NaN<sub>3</sub>; Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 2 % Triton® X-114) und anschließend bei 150000 x g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert und das Pellet in vier Wiederholungen in Waschpuffer gelöst. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Überstände für 10 min bei 37 °C und eine Zentrifugation bei 1000 x g, 21 °C für 10 min. Die obere wässrige Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und das Probenvolumen bestimmt. Der unteren hydrophoben Phase wurde Waschpuffer mit dem Volumen der entnommen wässrigen Phase zugesetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 21 °C) und mehrmalige Wiederholung der Phasentrennung.

Vor dem Auftragen auf die SDS-PAGE wurden die Proteine der wässrigen Phase mit 20 % (V/V) Trichloressigsäure gefällt, 10 min bei -20 °C inkubiert und anschließend bei 14000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die Pellets wurden mit eiskaltem Aceton gewaschen und danach luftgetrocknet und mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt.

Die Proteine der hydrophoben Phase wurde durch Zugabe von eiskaltem (1:5 % (V/V)) Aceton bei -20 °C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation (14000 x g, 4 °C, 30 min) und Trocknung der Proben wurden diese mit 10 µl SDS-Probenpuffer gemischt.

Als weiteres Detergenz kam Digitonin zum Einsatz, welches 2%ig in 50 mM Tris-Malonat pH 7,0 und 4 mM DTT gelöst wurde. Die Membranproteine wurden mit einer Konzentration von 5 mg/ml im Puffer über Nacht bei 4 °C resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation mit 100000 x g für 1 h bei 4 °C. Überstand und Pellet wurden getrennt und für die SDS-PAGE wie oben beschrieben vorbereitet.

### **2.6. Herstellung des Rohextraktes für DNA-Protein-Interaktionsversuche**

Die Herstellung des Rohextraktes von *S. multivorans* erfolgte durch Ernten einer sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindenden Kultur (10000 x g, 4 °C, 10 min). Das Zellsediment wurde gewaschen und anschließend in Lysepuffer (50 mM Tris·HCl pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM DTT; Protease-Inhibitor-Mix (cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, Roche Diagnostics, Mannheim) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über die French Press®. Zelltrümmer und Membranen wurden durch Zentrifugation (90000 x g, 4 °C, 35 min) entfernt.

Abschließend wurde die Proteinkonzentration des Rohextraktes durch Dialyse erhöht. Der Überstand wurde für 4 h bei 4 °C gegen 20 % (m/V) PEG 20.000 in 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM DTT dialysiert (Porengröße 25 Å, Visking Dialysis Tubes, Serva, Heidelberg).

## **2.7. Molekularbiologische Methoden**

### **2.7.1. Isolierung genomischer DNA aus *S. multivorans***

Zur Isolation genomischer DNA wurden 0,2 g Zellen in 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) resuspendiert und für 5 min bei 16100 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 200 µl TE-Puffer resuspendiert, mit 100 µl 10 % (m/V) SDS versetzt und bei 65 °C für 30 min inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand mit 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl 96 % Ethanol gemischt. Die Fällung der enthaltenen DNA erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation bei -20 °C. Danach folgten eine weitere Zentrifugation, Waschen des Präzipitates mit 500 µl 70 % Ethanol und Trocknung bei 50 °C für 10 min. Die DNA wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> resuspendiert und die RNA durch Zusatz von RNase I (4 µl, 5 mg/ml) bei einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C abgebaut.

### **2.7.2. DNA-Gelelektrophorese**

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine horizontale Gelelektrophoreseanlage (Mini Sub<sup>®</sup> Cell GT, BioRad, München) mit einem TAE-Puffersystem (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) verwendet. Die Gele enthielten 1,0 % (m/V) Agarose und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die DNA-Proben mit 6 x Probenladepuffer (Loading Dye Solution, Fermentas, St. Leon-Rot) im Verhältnis 1:5 gemischt und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (7 V/cm, 1 h, Raumtemperatur). Die Auswertung erfolgte mit einer Geldokumentationsanlage (Image Master<sup>®</sup> VDS, GE Healthcare, Freiburg).

### **2.7.3. Herstellung von DNA-Fragmenten zur Anreicherung DNA-bindender Proteine**

Für die Anreicherung wurden DNA-Fragmente upstream von *pceA* aus *S. multivorans* mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten 5'-Primer waren mit Biotin markiert, was die Kopplung

der DNA-Fragmente an den mit Streptavidin behandelten Magnetbeads ermöglichte. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Anschließend wurden freie Primer mittels Microcon 30 K Konzentratoren (Milipore, Schwalbach) durch Zentrifugation (13600 x g) entfernt.

**Tabelle 4. Verwendete Primer zur Herstellung von DNA-Fragmenten zur Kopplung an Magnetbeads**

Primernamen	Sequenz (3' → 5')
AN5	<sup>3162</sup> AACACATTAAAAATAAATAACTGTACTTGGGG <sup>3194</sup>
AN6	<sup>3135</sup> TGATATACAAAAGTTATAGCTTTGTTATAG <sup>3106</sup>
AN18	<sup>3090</sup> AAAATCTATATCTTTCCTATAACAAAGC <sup>3117</sup>
AN26	<sup>2904</sup> AAG CGA ATA AAA CAT AAA ATA TTA GGG ACG <sup>2933</sup>
AN26_Bio-TEG_for*	<sup>2904</sup> AAGCGAATAAAACATAAAATATTAGGGACG <sup>2933</sup>
pceA_Sm_Tfpur_rev*	<sup>3350</sup> TCGTTGCTGCAGCTCCACCTCCG <sup>3328</sup>
TF-Pur_3217_rev	<sup>3217</sup> TTCTTGTAACCTTTTATAAATAACCCC <sup>3191</sup>

\* an 5'-Position Biotin gekoppelt

Positionsangaben beziehen sich auf 6 kb großes *EcoRI*-Fragment aus der genomischen DNA von *S. multivorans*, GenBank accession no. AF022812 (Neumann *et al.* 1998)

Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 50 ng Template (genomische DNA aus *S. multivorans*); 25 pmol Primer; 2,5 U *Taq*-Polymerase; 0,5 U *Pfu*-Polymerase; 10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 200 µM dNTPs und wurde abschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 25 µl aufgefüllt. Das PCR-Programm wurde mit einem PCR-Gerät (Mastercycler Personal, Eppendorf) mit folgenden Parametern durchgeführt: Start-Denaturierung (3 min, 96 °C) und 34 Zyklen für die Polymerisation (0,6 min; 96 °C; 1 min; 50 °C; 1,5 min; 72 °C).

#### 2.7.4. RT-PCR-Analysen des *pceA*-Transkripts

Der Gesamt-RNA-Gehalt von *S. multivorans* wurde mit einem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Anweisung des Herstellers isoliert, wobei 1·10<sup>9</sup> Zellen eingesetzt wurden. Die Entfernung der DNA erfolgte mit DNase I (RNase free, Roche, Grenzach-Wyhlen) bei 37 °C für 1 h. Anschließend wurde die DNase bei 75 °C für 15 min inaktiviert. Die reverse Transkriptase (RT) Reaktion erfolgte mit 1 µg Gesamt-RNA unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kits (Qiagen, Hilden) bei 50 °C für 1 h. Im Anschluss daran wurde eine PCR mit Zugabe von 1 U-*Taq* Polymerase (segenetic, Borken) durchgeführt. Folgende Primer wurden verwendet: (5'→3') <sup>3162</sup>AAC ACA TTA AAA AAT AAA TAA CTG TAC TTG GGG<sup>3195</sup> und <sup>3501</sup>TGA



GTA AAC GCT GTT CGT ACT TCA GC<sup>3476</sup> (GenBank accession no. AF022812). Das PCR-Programm wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Start-Denaturierung (15 min, 96 °C) und 29 Zyklen für die Polymerisation (1 min, 96 °C; 0,5 min, 50 °C; 2 min, 72 °C).

## **2.8. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.8.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit dem vertikalen System „Minigel-Twin“ der Firma Biometra (Göttingen) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proteine wurden anhand ihrer Größe unabhängig von deren Ladung getrennt. Sofern nicht anders angegeben, wurden Trenn- und Sammelgele mit 12 % bzw. 6 % Polyacrylamid (Rotiphorese® Gel 30: Lösung Acrylamid/Bisacrylamid, Mischungsverhältnis 37,5:1; Roth, Karlsruhe) verwendet. Der Puffer für die Trenngele bestand aus 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 und 0,4 % (m/V) SDS während sich der Puffer für Sammelgele aus 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 und 0,4 % (m/V) SDS zusammensetzte. Die Polymerisation des Acrylamids wurde durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED gestartet. Der Tris-Glycin-Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 190 mM Glycin und 1 % (m/V) SDS. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem gleichen Volumen an Probenpuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % (m/V) SDS; 20 % (V/V) Glycerin; 10 % (V/V) Mercaptoethanol; 0,01 % (m/V) Bromphenolblau) versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 11 mA im Sammelgel und 22 mA im Trenngel. Als Größenstandard wurden 5 µl einer Markerproteinlösung (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen.

#### **2.8.1.1. Coomassie-Färbung**

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Auftrennung 15 min in Fixierlösung (25 % (V/V) Isopropanol, 10 % (V/V) Essigsäure) inkubiert und anschließend 30 min in Coomassie-Färbelösung (0,025 % (m/V) Coomassie Brilliant Blue G-250 in 10 % (V/V) Essigsäure). Abschließend erfolgte die Entfärbung der SDS-Gele in 10 % (V/V) Essigsäure.

### **2.8.2. 2D-Elektrophorese**

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Jehmlich *et al.* (2008). Zunächst wurden 250 µg der gelösten Proteinprobe, wie unter Abschnitt 2.5.2. beschrieben, mit dem gleichen

Volumen an 20 % (V/V) Trichloressigsäure gefällt und das Pellet gewaschen und getrocknet. Die Proben wurden in DeStreak™ Rehydrierungslösung mit 0,5 % (V/V) IPG nichtlinearem (NL) pH-Gradient Puffer (IPG Puffer pH 3-10 NL, GE Healthcare, Freiburg) gelöst und ausgefallenes Protein durch Zentrifugation (6200 x g, 15 min) entfernt. Ein Immobiline™ DryStrip™ (7 cm, pH 3-10 NL, GE Healthcare, Freiburg) wurde mit 135 µl des Überstandes beladen. Die Trennung in der ersten Dimension erfolgte über Nacht mit einer IPG Phore Elektrophoreseeinheit (GE Healthcare, Freiburg). Die Immobiline™ DryStripes™ wurden für 15 min in 50 mM Tris-HCl pH 8,8; 30 % (V/V) Glycerol; 6 M Harnstoff; 4 % SDS; 2 % DTT und 2,5 % Jodacetamid inkubiert und anschließend in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE getrennt.

### 2.8.3. Massenspektrometrie

Proteinspots wurden aus den Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und über Nacht mit Trypsin verdaut (Jehmlich *et al.* 2008). Die gewonnenen Peptide wurden mittels nano-LC separiert und durch direkte Kopplung an ein Massenspektrometer analysiert. Die Peptidtrennung erfolgte mit einer Zorbax Säule (300SB-C18 5 µm; Vorsäule: 4 mm, 40 nl; Trennsäule: 150 x 0,075 mm; Chip Cube (LC1100 Serie, Agilent Technologies, Böblingen)). Als Laufmittel diente 0,1 % Ameisensäure gelöst in Methanol mit einem Gradienten von 5-80 % innerhalb von 30 min. Die Analyse der Peptide erfolgte durch kontinuierliche MS/MS-Läufe (LC/MSD TRAP XCT Massenspektrometer, Agilent Technologies, Böblingen). Es wurde eine Kapillarspannung von 2000 V eingestellt und als Kollisionsgas diente Helium (Druck: 0,1 MPa) mit einer Kollisionsenergie von 40 V. Die eluierten Peptid-Ionen wurden kontinuierlich zwischen 300-1500 *m/z* abgetastet, während ab einem Grenzwert von 50000 automatisch in den MS/MS-Modus gewechselt wurde. In den MS/MS-Messungen wurde ein Vorlaufausschluss von 1 min mit einer Isolationsbreite von 4 *m/z* angewandt. Zur Kalibrierung wurden mit Trypsin verdautes BSA und Elektrospray-Ionisation (ESI) Tuning Mix (für Ion Trap, Agilent Technologies, Böblingen) verwendet.

Die erhaltenen Peptidmassen wurden durch eine Datenbank-Suche mittels MS/MS *ion search* (MASCOT, <http://www.matrixscience.com>) bekannten Bacteria-Proteinen, die bei NCBI nr (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>) hinterlegt wurden, zugeordnet. Dabei wurden folgende Parameter verwendet: Trypsin Verdau, bis zu einer fehlenden Schnittstelle; festgesetzte Modifikation: Carbamidomethylierung (Cystein); variable

Modifikationen: Oxidation (Methionin); Peptid Toleranz:  $\pm 1,2$  Da; MS/MS Toleranz:  $\pm 0,6$  Da; Peptid-Ladung: +1, +2 und +3.

### 2.8.2.3. LTQ-Orbitrap-MS-Messung

Proteinspots wurden wie oben beschrieben behandelt. Die tryptischen Peptide wurden in 0,1 % Ameisensäure aufgenommen und auf einer kurzen *reverse phase*-Säule (nanoAcquity UPLC® Säule, C18, 180  $\mu\text{m}$  x 2 cm, 5  $\mu\text{m}$ , Waters, Eschborn) mit 0,1 % Ameisensäure in Wasser (Flussrate: 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) gebunden. Nach 4 Minuten wurden die Peptide auf die Trennsäule (nanoAcquity UPLC® Säule, C18, 75  $\mu\text{m}$  x 100 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters, Eschborn, Deutschland) eluiert. Die chromatographische Trennung der Peptide erfolgte unter Verwendung einer nano-UPLC (nanoAcquity, Waters, Eschborn) mit einem Laufmittelgradienten von 8-40 % Lösung A (0,1 % Ameisensäure in 100 % Acetonitril) gegen Lösung B (0,1 % Ameisensäure in Wasser) innerhalb von 30 min. An die nano-UPLC war ein LTQ-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fischer Scientific, Schwerte) gekoppelt. Die Peptid-Ionen wurden kontinuierlich zwischen 400-2000  $m/z$  aufgenommen und ab 2000  $m/z$  wurde automatisch zu MS/MS CID gewechselt. Die Rohdaten der MS/MS-Spektren wurden mit der Software TurboRaw2Mgf (ProtQuantSuite V1.0.2708.25724) in mgf-Dateien umgewandelt und in der NCBI Datenbank (NCBI nr, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>) mit allen Einträgen für Bacteria verglichen. Dabei wurden folgende Parameter eingestellt: Trypsin Verdau, bis zu einer fehlenden Schnittstelle; festgesetzte Modifikation: Carbamidomethylierung (Cystein); variable Modifikationen: Oxidation (Methionin); Massentoleranz von 10 ppm für Vorläufer-Ionen: MS/MS Toleranz:  $\pm 0,2$  Da.

### 2.8.4. Western-Blot

Der Nachweis der PCE-Dehalogenase in Zellen und Zellextrakten erfolgte mittels Immunoblot mit spezifischen primären Antikörpern (John *et al.* 2006). Es wurden 2 x 1 ml einer sich in der späten exponentiellen Wachstumsphase befindenden Kultur durch Zentrifugation (16000 x g) geerntet. Ein Teil der Zellen wurde für eine spätere Proteinbestimmung bei -20 °C eingefroren. Der andere Teil wurde in 25  $\mu\text{l}$  Wasser resuspendiert und mit dem gleichen Volumen an SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend erfolgte eine Denaturierung bei 95 °C für 10 min. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Nach Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese für 1 h bei 15 V mit einer Semi-Dry-Blotanlage (Biorad, München) auf eine PVDF-Membran (Hybond™-P, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) übertragen. Vor dem Transfer wurde die Membran mit Methanol benetzt und zusammen mit dem SDS-Gel in Blotpuffer (3 g/l Tris; 14,4 g/l Glycin; 20 % (V/V) Methanol) äquilibriert. Zur Minimierung von Hintergrundsignalen erfolgte nach dem Transfer der Proteine eine Inkubation der Membran in 3 % Magermilchpulver (AppliChem, Darmstadt), gelöst in PBST-Puffer (140 mM NaCl; 10 mM KCl; 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05 % (V/V) Tween® 20). Nachfolgend wurde die Membran in PBST-Puffer gewaschen (3 x 10 min). Im Anschluss erfolgte die Inkubation (18 °C über Nacht) mit den PCE-Dehalogenase-spezifischen Antikörpern (1:50000 verdünnt in PBST-Puffer). Nach dem Waschen mit PBST-Puffer wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (1:20000 in PBST-Puffer, Anti-Kaninchen-Antikörper, Biorad, München) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gewaschen (3 x 10 min).

Die Detektion der Antikörper erfolgte mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase, die an die sekundären Antikörper gebunden ist, und einer Farbreaktion mit Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat-*p*-toluidinsalz (X-Phosphat). Nach dem Äquilibrieren in Entwicklerpuffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>) wurde die PVDF-Membran mit Entwicklungslösung (45 µl NBT (75 mg/ml in 70 % (V/V) DMF und 35 µl X-Phosphat (50 mg/ml in 100 % DMF)) überschichtet und entwickelt. Die Reaktion wurde mit Stopp-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA) gestoppt.

### **2.8.5. Anreicherung DNA-bindender Proteine im Promotorbereich von *pceAB***

Vor der Bindung wurden 200 ng Streptavidin-Magnetbeads (Streptavidin Magnetic Beads, 4 mg/ml, NEB, Frankfurt/Main) dreimalig mit 1 x Wasch- & Bindepuffer (1 x B&W; 5 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 1 M NaCl) gewaschen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Kopplung der DNA-Fragmente (100 pmol in 100 µl H<sub>2</sub>O; siehe Abschnitt 2.7.3., Seite 29) an die Beads, die in 100 µl 2 x B&W Puffer (5 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 2 M NaCl) suspendiert waren. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Beads dreimal mit 1 x B&W Puffer gewaschen.

Nachdem die mit den DNA-Fragmenten gekoppelten Streptavidin-Beads in 300 µl Bindungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 100 mM NaCl; 10 % (V/V) Glycerin; 0,05 % (V/V) Triton® X-100) äquilibriert wurden, erfolgten die Zugaben von 500 µl

Rohextrakt und 10 µl Kompetitor-DNA (Heringssperma-DNA, 10 mg/ml). Anschließend folgte unter leichtem Schwenken eine einstündige Inkubation des Ansatzes bei 4 °C. Nachdem die Beads mindestens 10-mal mit Bindungspuffer gewaschen wurden, erfolgte die schrittweise Elution der an die DNA gebundenen Proteine mit B&W Puffer. Die Elution erfolgte dabei mit steigender NaCl-Konzentration im B&W Puffer von 0,2 M bis 2,0 M. Anschließend wurden die Proteineluate mittels SDS-PAGE analysiert.

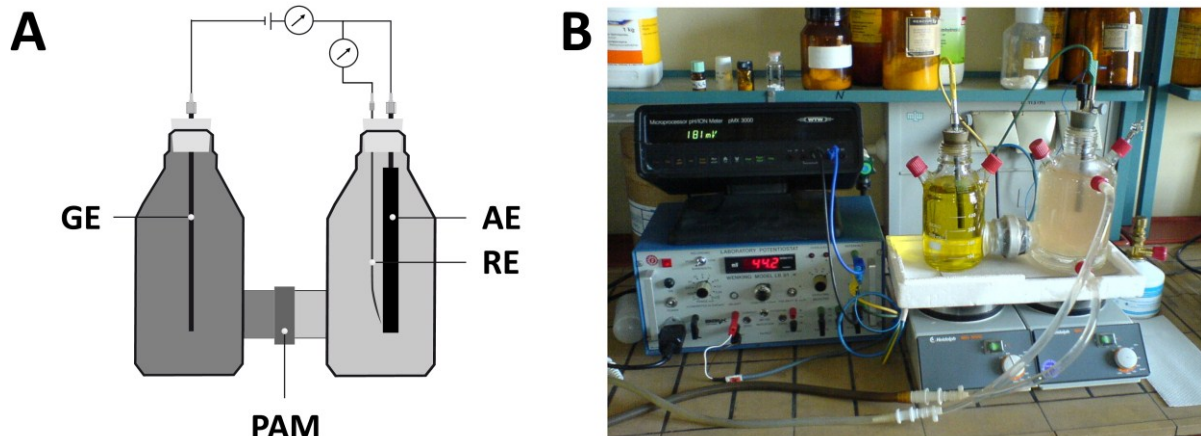
### **2.8.5.1. Regeneration der Streptavidinbeads**

Zur mehrmaligen Verwendung der Beads wurde die über Biotin gebundene DNA entfernt. Die Magnetbeads wurden in 200 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und anschließend langsam auf 70 °C erhitzt. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, der Überstand entfernt und die Beads in 1 x B&W Puffer gewaschen (Holmberg *et al.* 2005). Die Lagerung erfolgte in 50 mM KPP pH 7,5 bei 4 °C.

## **2.9. Redoxpotential im Medium**

### **2.9.1. Potentiostat-regulierte Kultivierung**

Ein Potentiostat bietet die Möglichkeit, ein definiertes und konstantes Redoxpotential an einer Elektrode anzulegen. Die Elektrode steht dabei in Kontakt mit der Versuchslösung, an die Elektronen von der Elektrodenoberfläche abgegeben oder aufgenommen werden. Die Verbindungen der Lösung können dadurch reduziert oder oxidiert werden. Das Potential (Spannung) dieser Elektrode (Arbeitselektrode) wird kontinuierlich in Relation zu einer Referenzelektrode gemessen. Wenn eine Potentialdifferenz zwischen Arbeits- und Referenzelektrode besteht, fließt ein Strom zur Gegenelektrode (Abbildung 8A). Der Potentiostat kann das Potential der Arbeitselektrode in Bezug zur Referenzelektrode auf ein gewünschtes Sollpotential regulieren, indem das Gerät einen Strom zwischen Arbeits- und Gegenelektrode fließen lässt. Für eine korrekte Arbeitsweise des Potentiostaten darf durch die Referenzelektrode selbst kein Strom fließen. Der Referenzpunkt wird durch das elektrochemische Potential der Referenzelektrode bestimmt.



**Abbildung 8. Potentiostat-regulierte Kultivierung**

(A) Schematische Darstellung des Aufbaus von Potentiostat, Elektroden und Kulturgefäß; **GE**: Gegenelektrode, **AE**: Arbeitselektrode, **RE**: Referenzelektrode, **PAM**: Protonen-Austausch-Membran (B) Fotografie des Versuchsaufbaus

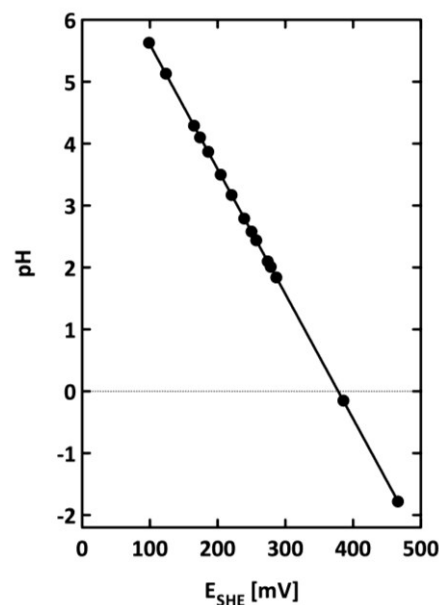
In dem verwendeten 3-Elektroden-System wurden Arbeits- und Gegenelektrode in getrennten Kompartimenten eingesetzt (Abbildung 8). Dafür wurden zwei Schottflaschen eingesetzt, die am Boden durch einen seitlichen Auslass miteinander verbunden wurden (Glasergerätebau Ochs, Bovenden). Das Medium wurde von der Gegenelektrodenlösung durch eine Protonen-durchlässige Membran (N-117, Dicke: 0,17 cm; Golden Energy Fuel Cell, GEFC™, Fuelcellstore, USA) voneinander getrennt. Die verwendeten Arbeits- und Gegenelektroden bestanden aus Graphitplatten (Phywe Systeme, Göttingen). Die Lösung für die Gegenelektrode bestand aus einer Mischung aus 0,5 M Kaliumhexacyanoferrat (II) und 0,5 M Kaliumhexacyanoferrat (III). Die Durchmischung der Lösung erfolgte mit Magnetrührern (MR MR3000, Heidolph, Schwabach). Es kam eine  $\text{Ag}^+/\text{AgCl}$ -Mikroreferenzelektrode (Ref100, Unisense A/S, Århus, Dänemark) mit einem Standardredoxpotential  $E_{\text{SHE}}$  von 207 mV (bei 21 °C) zum Einsatz. Der vom Potentiostaten (Wenking LB 81 M, Bank Elektronik, Göttingen) zur Regulation angelegte Strom wurde mit einem analogen Schreiber (LKB REC102 Zweikanal-Schreiber, Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgezeichnet. Die verwendeten Lösungen wurden vor dem Einsatz anaerobisiert. Die Kultivierungsflasche war zwecks Temperierung mit einem Doppelmantel ausgestattet. Vor dem Beginn des Versuches erfolgte eine Vorinkubation des Mediums über Nacht bei dem entsprechenden Sollpotential. Die Probennahmen erfolgten durch einen oberen seitlichen Zugang zur Kultivierungsflasche, der durch eine Septe abgedichtet wurde.

### 2.9.2. Einsatz von Mediatoren und redoxaktiven Verbindungen

Von redoxaktiven Verbindungen und Mediatoren wurden Stammlösungen hergestellt und durch Filtrieren sterilisiert. Die Zugabe der Verbindungen erfolgte nach dem Autoklavieren des Medium. Vor dem Animpfen der Kulturen und Start des Versuches, wurde das Redoxpotential des Mediums gemessen. Beim Einsatz von Mediatoren in Potentiostat-geregelten Kultivierungen wurden sie vor dem Einstellen des Sollpotentials dem Medium hinzugefügt.

### 2.9.3. Einstellen des Redoxpotentials durch Titration

Das Redoxpotential im Kultivierungsmedium von *S. multivorans* konnte über ein Fermenter-Steuergerät durch Titration konstant gehalten werden. In einem anerobisierten 2 l-Fermenter wurde eine Redoxelektrode installiert, die an einem pH-Messeingang angeschlossen war. Die Kalibrierung der Elektrode erfolgte durch Lösungen von 100 mM Kaliumhexacyanoferrat (II/III) in verschiedenen Mischungsverhältnissen. Dazu wurde die Redoxelektrode jeweils am pH-Wert-Anschluss und Redoxpotential-Anschluss an der Steuereinheit des Fermenters angeschlossen. Die erhaltenen Messwerte wurden gegeneinander graphisch aufgetragen und einer linearen Regression unterzogen (Abbildung 9).



**Abbildung 9. Eichung des Redoxpotentials auf entsprechende pH-Einheiten zur automatischen Titration mit einer Fermenter-Steuereinheit**

Formel der Regressionsgeraden:  $y = -0,0201 \cdot x + 7,6189$

Damit war es möglich,  $E_{\text{SHE}}$ -Werte in pH-Einheiten anzugeben und eine Titration durch die Kontrolleinheit durchzuführen. Abweichungen vom voreingestellten Sollpotential wurden durch automatische Zugaben von 100 mM Kaliumhexacyanoferrat (Mischung aus  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  und  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  von 1:7) justiert.

### **2.10. Sonstige Methoden**

#### **2.10.1. Herstellung von Titan(III)-citrat**

Die Herstellung von Titan(III)-citrat erfolgte nach Zehnder & Wuhrmann (1976) unter anoxischen Bedingungen in einer Anaerobierkammer (COY Laboratories, Grass Lake, Michigan, USA). Um 20 ml Titan(III)-citrat-Lösung herzustellen, wurden 10 ml 0,4 M Natriumcitrat pH 7,0 unter Rühren zu 4 ml Titan(III)-chloridlösung (15%ig, Riedel-de Haën, Seelze) gegeben. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  auf einen Wert von 7,0 bis 7,5 eingestellt. Zum Abschluss wurde die Lösung mit Wasser auf das Endvolumen von 20 ml aufgefüllt und bei 4 °C unter Sauerstoffausschluss gelagert.

#### **2.10.2. Verwendete Chemikalien und Gase**

Die für die Durchführung der Experimente verwendeten Chemikalien und Biochemikalien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Fermentas (St. Leon-Rot), Gerbu (Gaiberg), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Sigma Aldrich (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Gase wurden von der Firma Linde (Leuna) bezogen und besaßen folgende Reinheiten: Stickstoff (Reinheit 5.0), Kohlendioxid (Reinheit 4.5), Wasserstoff (Reinheit 4.3), Formiergas (95 %  $\text{N}_2$ , 5 %  $\text{H}_2$ ) sowie Sauerstoff (Reinheit 3.5).

#### **2.10.3. Datenauswertung**

Die graphische Auswertung der gewonnenen Daten und Berechnung der Regression erfolgte mit der Software Prism® Version 5.0c der Firma Graphpad Inc. (San Diego, USA).



### 3. Ergebnisse

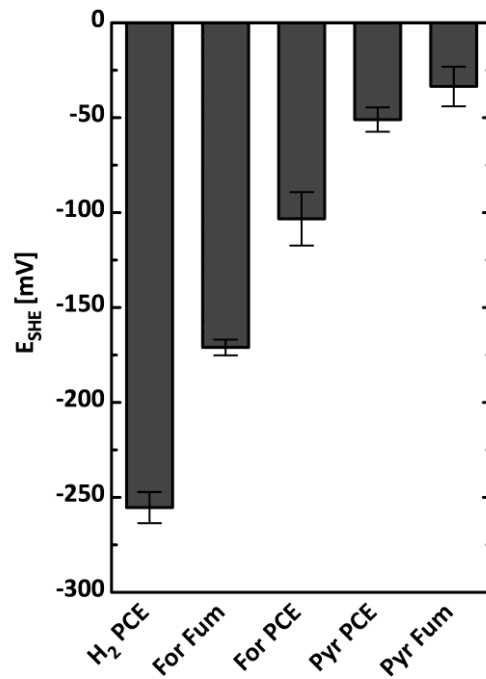
#### 3.1. Redoxpotential

Zahlreiche chlorierte Verbindungen, wie Tetrachlorethen (PCE), können im Aquifer durch Mikroorganismen reduktiv dehalogeniert werden. Dabei kommt es zur Bildung eines geochemischen Gradienten, der auch durch das Redoxpotential gekennzeichnet wird. Die reduktive Dechlorierung von PCE wird in *Sulfurospirillum multivorans* von der PCE-Dehalogenase katalysiert, die einen Corrino-Cofaktor besitzt. Für eine korrekte biologische Funktion des Enzymes muss der Cofaktor in der superreduzierten Cobalamin(I) Form vorliegen. Das Redoxpotential des Redoxpaar  $\text{Cob}^{\text{II}}/\text{Cob}^{\text{I}}$  beträgt -380 mV (pH 7,0). Gegenstand der Untersuchungen war, inwiefern das Redoxpotential des Mediums die reduktive Dechlorierung von PCE in *S. multivorans* beeinflusst.

##### 3.1.1. Redoxpotential während der Kultivierung von *S. multivorans*

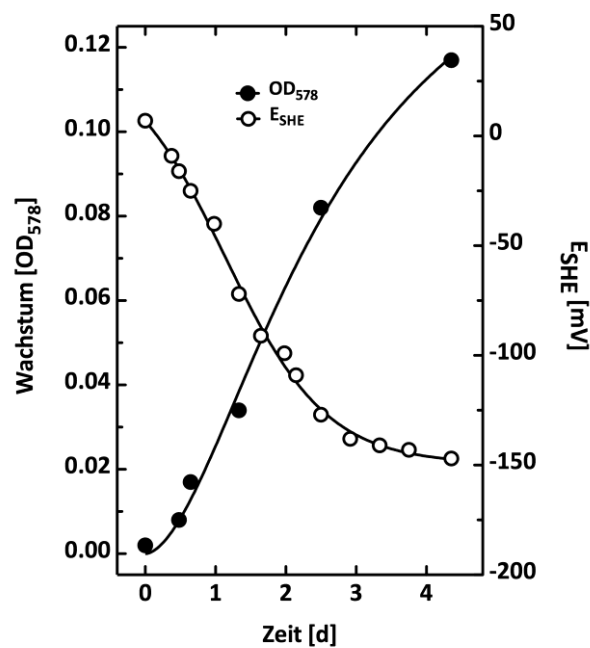
Zunächst sollte geklärt werden, welches Redoxpotential ( $E_{\text{SHE}}$ ) in unbeimpftem Medium vorliegt. Dafür wurde mit einer Redoxelektrode das Redoxpotential im Kultivierungsmedium unter Zusatz verschiedener Substrate gemessen (Tabelle 5). Um einen Einfluss von Sauerstoff ( $E^0 \square \text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = +810 \text{ mV}$ , Wood 1988) auszuschließen, wurden die Messungen unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Abbildung 10 zeigt das Redoxpotential im Medium in Abhängigkeit verschiedener Substrate nach 24-stündiger Kultivierung von *S. multivorans*. Enthielt das Medium Wasserstoff, lag  $E_{\text{SHE}}$  mit -250 mV am niedrigsten. Bei Zusatz von Formiat lag der Wert zwischen -175 und -100 mV und bei Pyruvat zwischen -50 und -25 mV. Das Redoxpotential vom Medium mit Formiat und Fumarat lag niedriger (-175 mV) als mit Formiat und PCE (-100 mV). Allerdings erreichte es bei Pyruvat und Fumarat höhere Werte (-25 mV) als bei Pyruvat und PCE (-50 mV).

Weiterhin wurde untersucht, ob sich das Redoxpotential des Mediums im Laufe der Kultivierung einer statischen (batch) Kultur von *S. multivorans* verändert. Der Organismus wurde in einen anaeroben, geschlossenen Fermenter mit 40 mM Pyruvat und 40 mM Fumarat bei 28 °C kultiviert. Die optische Dichte ( $\text{OD}_{578}$ ) und das Redoxpotential ( $E_{\text{SHE}}$ ) in Abhängigkeit von der Zeit sind in Abbildung 11 dargestellt. Das Wachstum ging einher mit einer gleichzeitigen Abnahme des Redoxpotentials von 7 mV auf -146 mV ( $\Delta E_{\text{SHE}} = -154 \text{ mV}$ ). Allerdings ist die Abnahme von  $E_{\text{SHE}}$  gegen Ende der Kultivierung nur noch sehr gering. Der Wert blieb konstant bei ca. -150 mV.



**Abbildung 10. Redoxpotential von Medium unter Zusatz verschiedener Substrate nach 24-stündiger Kultivierung**

**For:** Formiat, **Fum:** Fumarat, **Pyr:** Pyruvat (jeweils 40 mM), **PCE:** Tetrachlorethen (10 mM), **H<sub>2</sub>:** 0,5 bar Überdruck; Medium wurde anaerobisiert und bei 28 °C für 24 h inkubiert; Messung des Redoxpotentials erfolgte in einer Anaerobierkammer



**Abbildung 11. Verlauf des Redoxpotentials während einer Kultivierung von *S. multivorans* auf 40 mM Pyruvat und 40 mM Fumarat**

$E_{SHE}$  (○), optische Dichte (●); Experimentelle Bedingungen: Kultivierung im Fermenter, durch N<sub>2</sub>-Begasung anaerobisiert, Temperatur: 28 °C, Rührer: 130 U·min<sup>-1</sup>, konstanter pH-Wert (7,3), Inokulum 10 %

Die Abhängigkeit des Verlaufs des Redoxpotentials von Medium mit verschiedenen Substraten wurde in weiteren Wachstumsversuchen überprüft (Abbildung 10, Tabelle 5). Das Redoxpotential reduzierte sich in allen Kultivierungen von einem Startwert mit der Zunahme der OD<sub>578</sub>. Je nach zugesetzter Substratkombination war ein unterschiedlich stark negatives Redoxpotential in der späten exponentiellen bzw. stationären Wachstumsphase zu messen (Tabelle 5). Die durchschnittlichen Werte lagen zwischen -32 mV bei Pyruvat/Fumarat und -255 mV bei H<sub>2</sub>/PCE.

**Tabelle 5. Redoxpotentiale des Mediums in stationärer Wachstumsphase von *S. multivorans* auf verschiedenen Substraten**

Substrate	E <sub>SHE</sub> des Mediums vor Animpfen	E <sub>SHE</sub> nach 24 h Kultivierung
H <sub>2</sub> / PCE	-312 mV	-255 mV
Formiat / Fumarat	+135 mV	-171 mV
Formiat / PCE	+161 mV	-127 mV
Pyruvat / PCE	+103 mV	-51 mV
Pyruvat / Fumarat	+5 mV	-32 mV

Eingesetzte Konzentrationen: Formiat, Pyruvat, Fumarat: 40 mM; PCE: 10 mM in Hexadecan, H<sub>2</sub>: 0,5 bar Überdruck

### 3.1.2. Veränderung von E<sub>SHE</sub> durch redoxaktive Substanzen

Der Einfluss des Redoxpotentials auf die Dechlorierung von PCE sollte in folgenden Versuchen näher untersucht werden. Zum einen wurde der Einfluss des E<sub>SHE</sub> auf eine wachsende Kultur untersucht. Zum anderen sollten ruhende Zellen eingesetzt werden, um den Einfluss speziell auf den Energiestoffwechsel festzustellen. In dem Medium bzw. Puffer mit Formiat und PCE, sollten unterschiedliche Redoxpotentiale eingestellt werden und anschließend die Kultivierung von *S. multivorans* begonnen werden. Durch den Zusatz verschiedener redoxaktiver chemischer Verbindungen wurde versucht, das Redoxpotential des Mediums zu beeinflussen.

#### 3.1.2.1. Ruhende Zellen

In Vorversuchen wurden zahlreiche redoxaktive Substanzen (Tabelle 6) dem Medium hinzugegeben und *S. multivorans* mit Pyruvat und PCE kultiviert (Tabelle 7). Der Einfluss eines positiven Redoxpotentials stand dabei in besonderem Interesse, da die Kultivierungsversuche (Abbildung 11, Tabelle 5) zeigten, dass das Redoxpotential des

Mediums während des Wachstums reduziert wurde und  $< 0$  mV war. Durch Zugaben von Kaliumhexacyanoferrat(III) konnte bereits bei geringen Konzentrationen ein positives Redoxpotential gemessen werden. Dadurch gelang es, Medium und Zellsuspensionspuffer mit einem  $E_{SHE}$  von +400 mV zu verwenden. Der Einfluss des Redoxpotentials auf den Energiestoffwechsel in ruhenden Zellen ist in Abbildung 12 dargestellt.

**Tabelle 6. Verwendete redoxaktive Chemikalien zur Beeinflussung des Redoxpotentials des Mediums und Zellsuspensionspuffer**

Verbindung	$E_{SHE}^1$ [mV]	Verbindung	$E_{SHE}^1$ [mV]
Kaliumhexacyanoferrat	408	Neutralrot	-329
5-Sulfosalicylsäure	100	Ti(III)-Citrat	-480 <sup>3</sup>
Ascorbinsäure	58	Cystein	-145 <sup>2</sup>
Fe(II)-Oxalat	5	Safranin T	-289
Na-Dithionit	-660	Methylenblau	11

<sup>1</sup> angegeben ist das Standardredoxpotential der Verbindung (Wilson 1978)

<sup>2</sup> Jones *et al.* 2004

<sup>3</sup> Zehnder & Wuhrmann 1976

**Tabelle 7. Einfluss von redoxaktiven Verbindungen auf Wachstum und Redoxpotential**

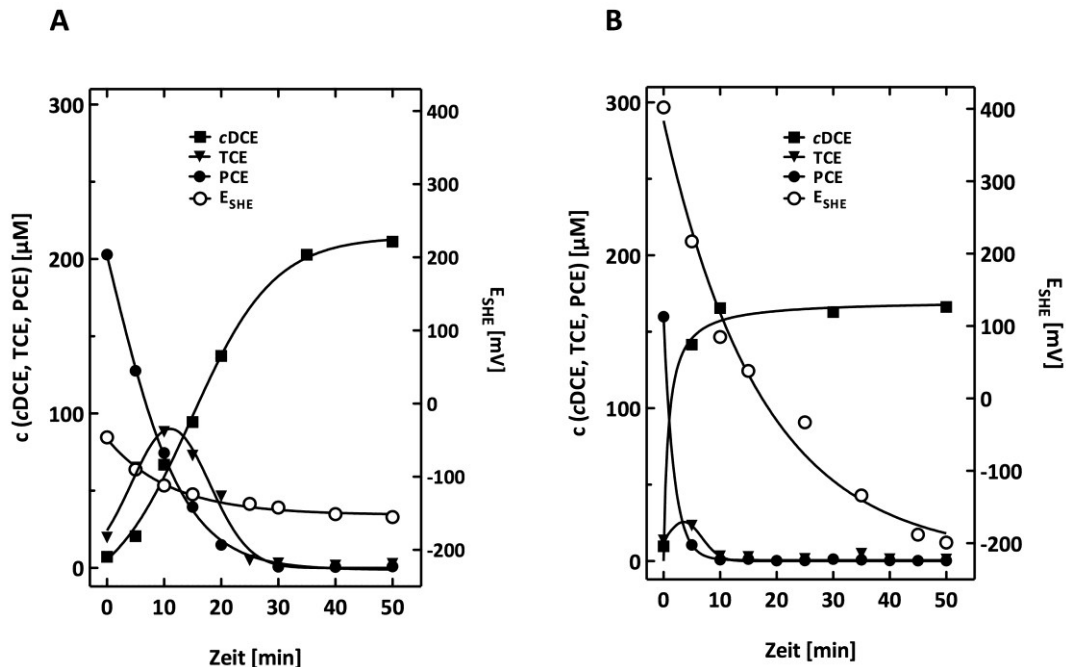
	OD <sub>578</sub>				$E_{SHE}$ [mV]			
	M	0 h	24 h	48 h	M	0 h	24 h	48 h
Kontrolle	0,028	0,051	0,166	0,365	-6	-20	-12	-17
Ascorbinsäure	0,034	0,049	0,091	0,285	-109	-112	-119	-75
5-Sulfosalicylsäure	0,031	0,058	0,157	0,203	130	3	-10	22
1,1 mM Fe(II)-Oxalat	0,087	0,117	0,303	0,386	277	-15	-9	92

M: Medium vor dem Animpfen (40 mM Pyruvat, 10 mM PCE)

In diesen Experimenten wurde eine Zelldichte mit einer OD<sub>578</sub> von 0,2 eingestellt. PCE wurde im Puffer direkt gelöst, um dessen Umsatz ohne Einfluss einer Hexadecan-Phase untersuchen zu können. Als Elektronendonator diente Formiat (40 mM). Die Durchführung erfolgte in einer Anaerobierkammer, um einen Einfluss von Sauerstoff auf  $E_{SHE}$  auszuschließen.

Der Abbau von PCE zu TCE und cDCE erfolgte unmittelbar nach Beginn des Versuches, während das Redoxpotential von zirka -50 mV auf -150 mV sank (Abbildung 12A). Der Umsatz von PCE war nach zirka 30 Minuten beendet und das  $E_{SHE}$  veränderte sich ab diesem

Zeitpunkt nur noch geringfügig. In einem weiteren Experiment wurde dem Zellsuspensionspuffer 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) zugegeben, um das Redoxpotential des Mediums zu verändern (Abbildung 12B).



**Abbildung 12. Einfluss des Redoxpotentials auf die reduktive Dechlorierung von PCE in Zellsuspensionen**  
(A) Kontrollversuch, (B) Redoxpotential wurde im Zellsuspensionspuffer mit 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) eingestellt; (○)  $E_{\text{SHE}}$ , (●) PCE, (▼) TCE, (■) cDCE; Inkubation in Serumflaschen mit 100 ml Zellsuspensionspuffer bei 28 °C unter Rühren ( $100 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ) in einer Anaerobierkammer; Zelldichte:  $\text{OD}_{578}$  0,2; berechnete Ausgleichskurven

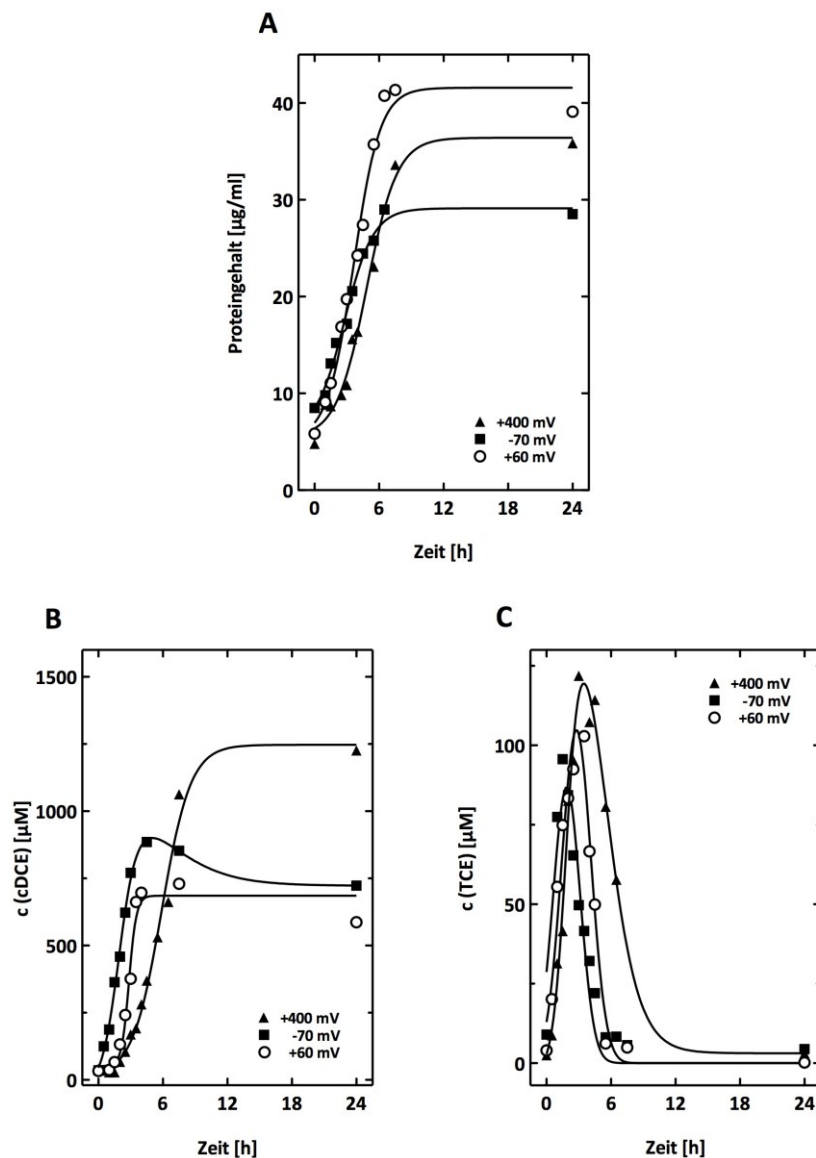
Dieses lag unter diesen Bedingungen bei +400 mV, reduzierte sich allerdings sofort nach dem Start des Versuches und erreichte innerhalb von 50 Minuten einen Wert von -200 mV. Der Abbau von PCE setzte direkt nach Zugabe von Formiat ein und war nach zirka 10-15 Minuten abgeschlossen. Jedoch lag die gelöste PCE-Konzentration niedriger als im Kontrollexperiment (Abbildung 12A). Zum Zeitpunkt, bei dem der PCE-Umsatz beendet war, lag  $E_{\text{SHE}}$  bei zirka +25 mV, umfasste somit während der Dechlorierung von PCE einen Bereich von +400 bis +25 mV.

### 3.1.2.2. Wachsende Kulturen

Zur Prüfung des Einflusses des Redoxpotentials auf das Wachstum von *S. multivorans* wurden dem Kultivierungsmedium (40 mM Formiat, 10 mM PCE in Hexadecan, 5 mM Acetat)

redoxaktive Verbindungen zugesetzt und die Wachstumsparameter (Proteingehalt, Konzentrationen an TCE und cDCE) bestimmt (Abbildung 13 A-C).

Die Messung des Redoxpotential erfolgte zu Beginn und Abschluss des Versuches. Es gelang durch Zugabe folgender Substanzen verschiedene Redoxpotentiale im Medium bei  $t = 0$  h zu erhalten: 5 mM Kaliumhexacyanoferrat [III] ( $E_{\text{SHE}} +400$  mV), 5 mM Natriumdithionit ( $E_{\text{SHE}} -70$  mV) und ohne Zusatz ( $E_{\text{SHE}} +60$  mV). Nach Abschluss des Wachstums nach 24 h konnte jeweils ein Redoxpotential von rund -60 mV gemessen werden.



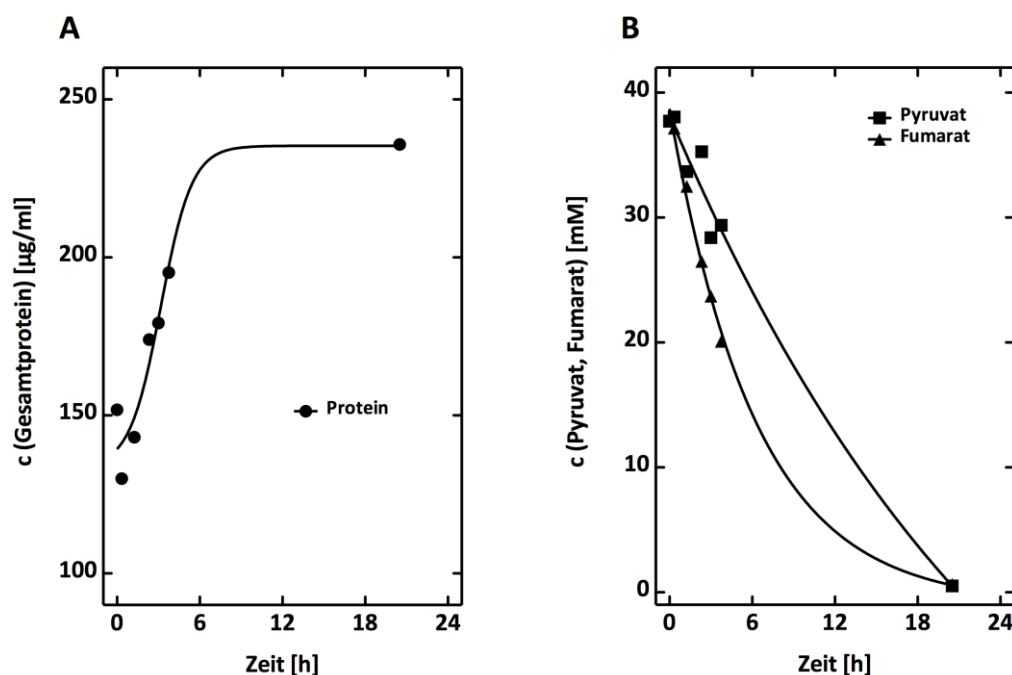
**Abbildung 13. Einfluss des Redoxpotentials des Mediums auf Wachstum und Dechlorierung von PCE zu Beginn der Kultivierung von *S. multivorans***

Das Redoxpotential des Mediums wurde mit 5 mM Kaliumhexacyanoferrat ( $\blacktriangle$ ), 5 mM Dithionit ( $\blacksquare$ ) variiert. Als Kontrolle ( $\circ$ ) diente Medium ohne Redoxpuffer. Die gemessenen Redoxpotentiale zum Beginn des Versuches sind angegeben. Kultivierung erfolgte bei  $28^\circ\text{C}$ , Schüttler:  $130\text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ , Inokulum 10 %. Dargestellt sind Verlauf des Proteingehaltes (A), cDCE- (B) sowie TCE-Konzentration (C). Berechnete Ausgleichskurven

Die Bildung von Proteingehalt und cDCE war in der Kultur, die Ferricyanid enthielt, gegenüber der Kontrollkultur und der Kultur, die Na-Dithionit enthielt, durch eine längere Anlaufphase gekennzeichnet (Abbildung 13 A, B). Dabei zeigte die Kultur mit Na-Dithionit die kürzeste Anlaufphase in der cDCE-Bildung. Die Verzögerungen in der TCE-Bildung unterschieden sich nur geringfügig (Abbildung 13 C). Nach 24-stündiger Kultivierung konnte in allen Kulturen eine Zunahme von Proteingehalt und cDCE-Konzentration verzeichnet werden. TCE war zum Abschluss des Experimentes nicht mehr nachweisbar. In diesen Untersuchungen schien ein Redoxpotential mit positiveren Werten mit einer leichten Verlängerung der Anlaufphase einherzugehen.

### **3.1.2.3. Konstantes Redoxpotential durch kontinuierliche Titration**

In den vorherigen Versuchen war das Redoxpotential nicht über den gesamten Versuchszeitraum stabil. In einem geänderten Versuchsaufbau sollte durch wiederholte Zugaben von Kaliumhexacyanoferrat das Redoxpotential im Medium konstant gehalten werden. Die Verbindung bewirkte schon in geringen Konzentrationen eine Verschiebung des  $E_{\text{SHE}}$  auf +400 mV. Durch kontinuierliches Messen mit einer Redoxelektrode wurde über ein Fermentersteuergerät und durch Zugabe von Lösungen an Kaliumhexacyanoferrat (II) und (III) das Redoxpotential auf +400 mV titriert. Das Medium in diesem Vorversuch enthielt 40 mM Pyruvat und 40 mM Fumarat als Substrate (ohne Zusatz von Hefeextrakt). Nachfolgend sollten die Versuche mit Formiat und PCE durchgeführt werden. Die Zelldichte wurde auf  $OD_{578} = 0,4$  (140  $\mu\text{g/ml}$  Proteingehalt) eingestellt. In der Abbildung 14 sind Zunahme der Proteinkonzentration und Verbrauch von Pyruvat und Fumarat dargestellt. Kurz nach dem Animpfen nahm ohne erkennbare Anlaufphase der Proteingehalt, als Maß für das Wachstum, bis zum Ende der Kultivierung auf 236  $\mu\text{g/ml}$  ( $\Delta 85 \mu\text{g/ml}$ ) zu (Abbildung 14A). Ebenfalls ohne Anlaufphase startete die Abnahme der Pyruvat- und Fumaratkonzentration, wobei die Verbrauchsrate bei Fumarat mit  $4,7 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  höher ausfiel, als bei Pyruvat mit  $2,2 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  (Abbildung 14B). Das Redoxpotential blieb während des gesamten 20-stündigen Experimentes konstant (Daten nicht gezeigt). Allerdings waren zur Titration große Mengen der Blutlaugensalze erforderlich. Daraus resultierte eine Konzentration von ungefähr 20 mM im Medium. Somit war der Einfluss von Kaliumhexacyanoferrat auf den Stoffwechsel nicht auszuschließen und die Weiterführung der Versuch wurde eingestellt.



**Abbildung 14. Wachstum von *S. multivorans* auf Pyruvat und Fumarat bei konstantem  $E_{SHE}$  von +400 mV**

$E_{SHE}$  von +400 mV wurde über kontinuierliche Titration mit Kaliumhexacyanoferrat (II)/(III) konstant gehalten; (A) Zunahme der (●) Proteinkonzentration, (B) Abnahme der (■) Pyruvat- und (▲) Fumaratkonzentration; Kultivierungsbedingungen: 28 °C, 130 U·min<sup>-1</sup>; Inokulum 10 %, Medium wurde durch N<sub>2</sub>-Begasung anaerobisiert, berechnete Ausgleichskurven

### 3.1.3. Regulierung des Redoxpotentials mit einem Potentiostaten

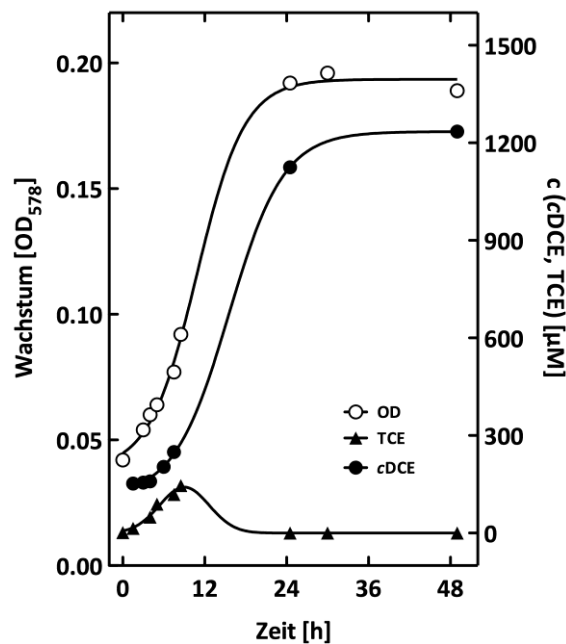
Die kontinuierliche Redoxtitration stellt eine Möglichkeit dar, dass Redoxpotential des Mediums auf definierte Werte einzustellen und über die Dauer des Experimentes konstant zu halten. Allerdings werden für diese Änderung des Redoxpotentials verschiedene redoxaktive Substanzen benötigt, die in hoher Konzentration schrittweise dem Medium zugeführt werden. Hier kann allerdings ein möglicher Einfluss der Chemikalien auf den Organismus nicht ausgeschlossen werden.

Eine weitere vielversprechende Methode zur Beeinflussung des Redoxpotentials ist der Einsatz von Elektroden, die durch einen Potentiostaten geregelt, Elektronen an Verbindungen im Medium abgeben oder aufnehmen. Dies kann zu einem definierten und konstanten Redoxpotential im Medium führen.

#### 3.1.3.1. Wachstum von *S. multivorans* bei unterschiedlichen Redoxpotentialen

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss des Redoxpotentials, reguliert über einen Potentiostaten, auf Wachstum und Dechlorierung von PCE in *S. multivorans* untersucht.

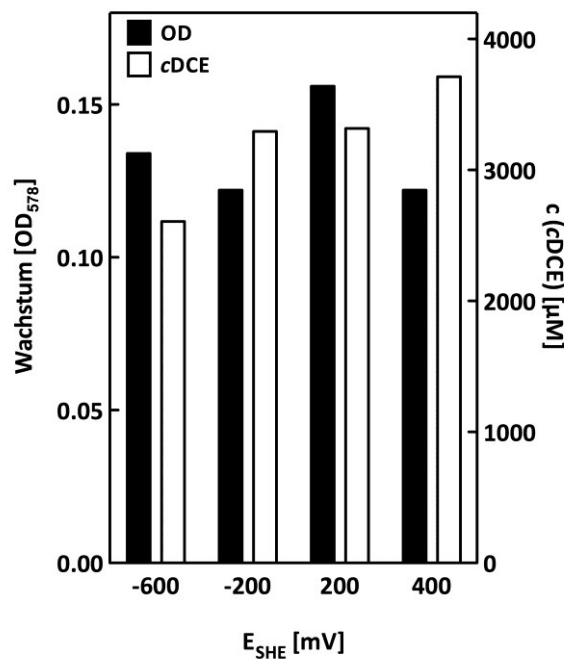




**Abbildung 15. Wachstum von *S. multivorans* mit Formiat und PCE in einer Potentiostat-kontrollierten Kultur**  
 (○) OD<sub>578</sub>, (▲) TCE, (●) cDCE; vom Potentiostat reguliertes Sollpotential: -200 mV, Kultivierungstemperatur: 28 °C, Rührer: 200 U·min<sup>-1</sup>, Inokulum 10 %, Medium anaerobisiert, bei Sollpotential vorinkubiert, berechnete Ausgleichskurven

Da die Organohalid-Respiration im besonderen Interesse der Untersuchungen stand, fand die Kultivierung mit den Substraten Formiat und PCE, unter Zusatz von Acetat als C-Quelle, statt. Die Zunahme der optischen Dichte und Produktkonzentrationen (TCE, cDCE) aus dem PCE-Abbau bei  $E_{\text{SHE}}$  von -200 mV sind in Abbildung 15 zu sehen. Das Wachstum setzte nach dem Animpfen ein und erreichte nach 7 h eine maximale Wachstumsrate  $\mu$  von  $0,077 \cdot \text{h}^{-1}$  mit einer Verdopplungszeit von 9 h. Nach 30-stündiger Kultivierung erreichte die Kultur die stationäre Phase bei einer maximalen OD<sub>578</sub> von 0,2 ( $\Delta \text{OD}_{578} = 0,15$ ). Gleichzeitig mit dem Wachstum setzte die Dechlorierung von PCE ein und kam es vorübergehend zur Bildung von TCE. Die Freisetzung von cDCE setzte nach 6 h ein. Nach 48 h wurde eine maximale cDCE-Konzentration von 1,23 mM gebildet.

Um einen größeren Bereich des Redoxpotentials im Medium einzustellen, wurde dieses in Werten zwischen -600 mV und +400 mV variiert. *S. multivorans* wurde mit Formiat und PCE als Substrate kultiviert, wobei das Redoxpotential mit Hilfe des Potentiostaten eingestellt wurde. Die Zunahme der OD<sub>578</sub> und Bildung von cDCE nach 20-stündiger Kultivierung bei verschiedenen  $E_{\text{SHE}}$  sind in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16. Wachstum und Bildung von cDCE nach 20-stündiger Kultivierung bei unterschiedlichen Redoxpotentialen**

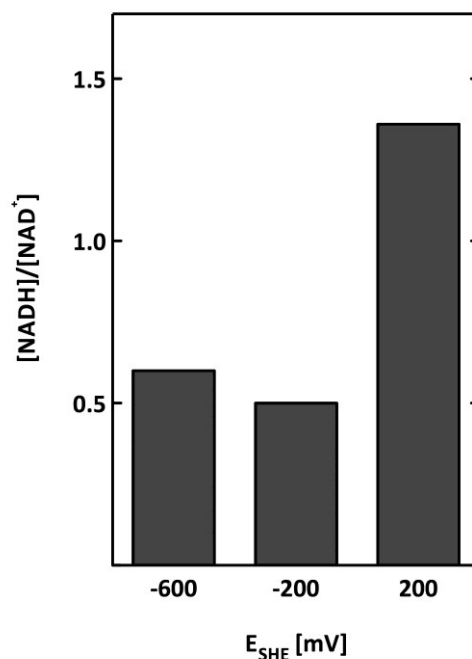
Die Einstellung des Redoxpotentials erfolgte über Elektroden und einen Potentiostaten, ■  $OD_{578}$ , □ cDCE [ $\mu M$ ]; Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C, Rührer: 200 U·min<sup>-1</sup>, angegebene Redoxpotentiale sind eingestellte Sollpotentiale am Potentiostaten, Medium (40 mM Formiat, 10 mM PCE, 5 mM Acetat) wurde anaerobisiert und bei Sollpotential vorinkubiert, Hauptkultur wurde 10%ig aus Vorkultur (*S. multivorans*; 40 mM Formiat, 10 mM PCE, 5 mM Acetat) angeimpft; Werte aus einer Versuchsreihe

Die maximale optische Dichte lag bei allen eingestellten Redoxpotentialen zwischen 0,12 und 0,15. Dabei erreichte sie bei +200 mV einen Maximalwert von 0,156. Die gebildeten cDCE-Mengen lagen zwischen 2,6 und 3,7 mM und die höchste Konzentration wurde bei  $E_{SHE}$  von +400 mV gemessen.

### 3.1.3.2. Innerzellulärer Redoxstatus

Das Verhältnis von  $[NADH]/[NAD^+]$  erlaubt einen Einblick in den intrazellulären Redoxstatus. Die Zelle besitzt eine Gesamtkonzentration an Nikotinamid-Adenin-Dinukleotiden, die je nach Redoxbedingungen in der Zelle in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen an reduzierten NADH und oxidierten  $NAD^+$  vorliegen. Dieses Verhältnis ist abhängig von den Stoffwechselprozessen, die als chemische Redox-Reaktionen angesehen werden können. Sollte ein außerhalb der Zelle vorherrschendes Redoxpotential Auswirkungen auf die Stoffwechselprozesse in der Zelle haben, könnte dies Änderungen des Redoxstatus von Nikotinamidadenindinukleotiden bewirken.

Aus diesem Grund wurde eine Extraktion und Konzentrationsbestimmung von NADH und  $\text{NAD}^+$  aus Zellen von *S. multivorans*, die aus Kultivierungen bei verschiedenen Redoxpotentialen stammen, durchgeführt. Die Verhältnisse von  $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$  wurden in Abhängigkeit der Redoxpotentiale zwischen -600 mV und +200 mV in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 17). Bei einem voreingestelltem  $E_{\text{SHE}} < 0$  mV lagen die Verhältnisse bei zirka 0,5. Im Gegensatz dazu stieg es bei  $E_{\text{SHE}}$  von +200 mV um das 2,5-fache auf 1,36. Die Werte stammen aus einer Versuchsreihe.



**Abbildung 17. Verhältnis von  $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$  in *S. multivorans* bei unterschiedlichen Redoxpotentialen**

Redoxpotentiale wurden über Elektroden und durch Regulation mittels Potentiostat eingestellt. Die Extraktion von NADH und  $\text{NAD}^+$  erfolgte in der späten exponentiellen Wachstumsphase Medium (40 mM Formiat, 10 mM PCE, 5 mM Acetat) wurde anaerobisiert und bei Sollpotential vorinkubiert, Temperatur: 28 °C, Inokulum: 10 %; Werte aus einer Versuchsreihe

### 3.1.3.3. Mediatoren in Potentiostat-regulierten Kulturen

Die Übertragung des Redoxpotentials von der Elektrode auf die Zellen kann unter Umständen durch den Einsatz von Mediatoren effizienter geschehen. Diese werden an der Elektrode reduziert oder oxidiert, um anschließend durch eine andere Verbindung wieder oxidiert oder reduziert zu werden. Die weitere Verbindung kann zum Beispiel ein Bestandteil einer Bakterienzelle wie Membranprotein oder extrazelluläres Enzym sein. Insofern erlaubt ein Mediator die „räumliche Verteilung“ des Redoxpotentials der Arbeitselektrode. Jedoch besitzt jede Mediatorsubstanz ein bestimmtes Redoxpotential zwischen reduziertem und

oxidiertem Zustand und damit einen eingeschränkten Potentialbereich, der übertragen werden kann. Es wurden zahlreiche Mediatoren, die in Tabelle 8 aufgelistet wurden, in Potentiostat-kontrollierten Kultivierungen eingesetzt und der Einfluss auf die Organohalid-Respiration überprüft.

**Tabelle 8. Eingesetzte Mediatoren zur Übertragung des Redoxpotentials von der Arbeitselektrode auf Zellen von *S. multivorans* in der Potentiostat-regulierten Kultivierung**

Verbindung	$E_{SHE}^1$ [mV]	Verbindung	$E_{SHE}^1$ [mV]
Kaliumhexacyanoferrat	422	Benzochinon	280
Safranin T	-289	Phenazinmethosulfat	80
Neutralrot	-329	Methylenblau	11
Methylviologen	-449	Toluylenblau	115
TMPD <sup>2</sup>	276		

<sup>1</sup> angegeben ist das Standardredoxpotential der Verbindung (nach Wilson 1978)

<sup>2</sup> N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin

Der Einfluss von N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin (TMPD) als Mediator auf Wachstum und Dechlorierung von PCE sind in der Tabelle 9 dargestellt. Nach 16-stündiger Kultivierung lag die OD<sub>578</sub> 24 % unter der gemessenen OD<sub>578</sub> in der Kontrolle ohne Mediator und nach 24 h betrug der Unterschied noch 17 %. Die Bildung von cDCE war im Vergleich zur Kontrolle nach 16 h um 79 % geringer, jedoch konnte nach 24 h in beiden die gleiche Konzentration bestimmt werden. Der Zusatz von 500 µM dieses Mediators verzögerte bei +250 mV Sollpotential die Zunahme der OD<sub>578</sub> und Entstehung von cDCE. Allerdings konnte keine Inhibierung der Organohalid-Respiration beobachtet werden. Bei Verwendung von 250 µM Methylenblau und 250 µM Neutralrot war die Dechlorierung von PCE kaum beeinflusst. Jedoch die Kombination beider Mediatoren reduzierte die Bildung von cDCE um 35 %.

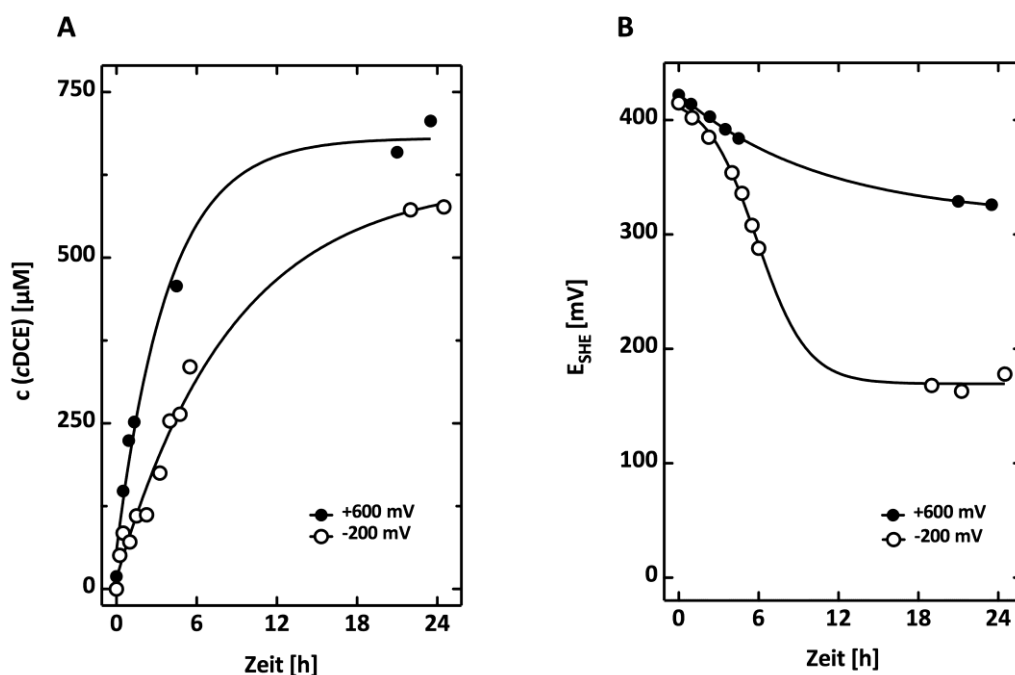
**Tabelle 9. Einfluss des Redoxmediators bei 250 mV Sollpotential N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin (Tetramethylphenylendiamin, TMPD) auf Wachstum und Umsatz von PCE**

Konzentration	OD <sub>578</sub>		cDCE [µM]	
	16 h	24 h	16 h	24 h
0 µM (Kontrolle)	0,17	0,24	1868	3108
500 µM TMPD	0,13	0,20	400	3150

OD<sub>578</sub> Vorkultur: 0,15; Inokulum: 10 %

### 3.1.3.4. Kontrolle der Redoxregulation durch den Potentiostaten

In den bisherigen Versuchen mit den Potentiostat-regulierten Elektroden konnte keine Aussage getroffen werden, welches Redoxpotential tatsächlich im Medium vorlag. Deshalb sollte in einem Kontrollversuch der Verlauf des Redoxpotentials des Mediums im Vergleich zum voreingestellten Sollpotential untersucht werden. Dazu erfolgte die Messung des Redoxpotential des Mediums mit einer zusätzlichen, vom Potentiostat-System unabhängigen, Redoxelektrode (Abbildung 18B). Zusätzlich wurden die Konzentrationen an cDCE bestimmt (Abbildung 18A).



**Abbildung 18. Verlauf des Redoxpotentials in einer Potentiostat-regulierten Kultur von *S. multivorans***

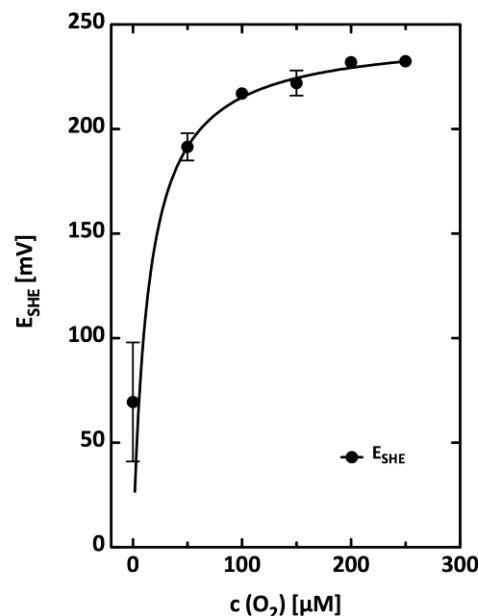
(A) Konzentration an cDCE und (B) Redoxpotential im Medium bei eingestellten Sollpotentialen von (●) +600 mV und (○) -200 mV; Medium (40 mM Formiat, 10 mM PCE, 5 mM Acetat), Vorinkubation bei eingestelltem Sollpotential, Inkubation bei 18 °C, Rührer: 200 U·min<sup>-1</sup>, Inokulum: 10 % aus Vorkultur mit gleicher Substratkombination

Das Medium enthielt neben Formiat und PCE als Substrate Kaliumhexacyanoferrat als Mediator und wurde für 18 h auf ein Sollpotential von +600 mV vorinkubiert. Nach dem Animpfen erfolgte die Einstellung der entsprechenden Sollpotentiale (+600 mV/-200 mV) für die Kultivierung. Abbildung 18B zeigt, dass das  $E_{\text{SHE}}$  bei einem eingestellten Sollpotential von -200 mV sofort nach dem Animpfen sank. Allerdings wurde nach 18-stündiger Kultivierung ein stabiler Wert erreicht, doch lag dieser bei ca. +200 mV statt bei -200 mV. Die Konzentration an cDCE stieg während der gesamten Kultivierung kontinuierlich bis zu einer

Konzentration von  $580 \mu\text{M}$  an, aber mit einem etwas kleinerem Anstieg als bei  $+600 \text{ mV}$  Sollpotential (Abbildung 18A). Bei Letzterem nahm die Konzentration an cDCE ebenfalls bis zum Ende des Experimentes auf ca.  $700 \mu\text{M}$  zu. Das Redoxpotential blieb jedoch trotz des eingestellten Sollpotentials von  $+600 \text{ mV}$  nicht stabil und sank während der Kultivierung langsam von  $+422 \text{ mV}$  auf  $+326 \text{ mV}$ . Gegen Ende des Experimentes (nach 21 h) erfolgte zwar ein Abfall des  $E_{\text{SHE}}$  mit einer langsameren Rate, dennoch konnte kein stabiler Wert gemessen werden. Dieser Versuch verdeutlichte, dass die Einstellung eines definierten und konstanten Redoxpotentials im Medium schwierig war und keine endgültigen Aussagen möglich waren.

### 3.1.3.6. Redoxpotential in mit Sauerstoff angereichertem Medium

Boden-Aquifer-Systeme sind in der Regel in aerobe (ungesättigte) und anaerobe (gesättigte) Zonen gegliedert und damit sind Mikroorganismen in diesem Habitat unterschiedlichen Konzentrationen an Sauerstoff ausgesetzt. Neben dem Einfluss des Redoxpotentials auf die Organohalid-Respiration, sollte auch der Einfluss von Sauerstoff auf diese Prozesse näher untersucht werden.



**Abbildung 19. Redoxpotential von Kultivierungsmedium bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in der Gasphase**

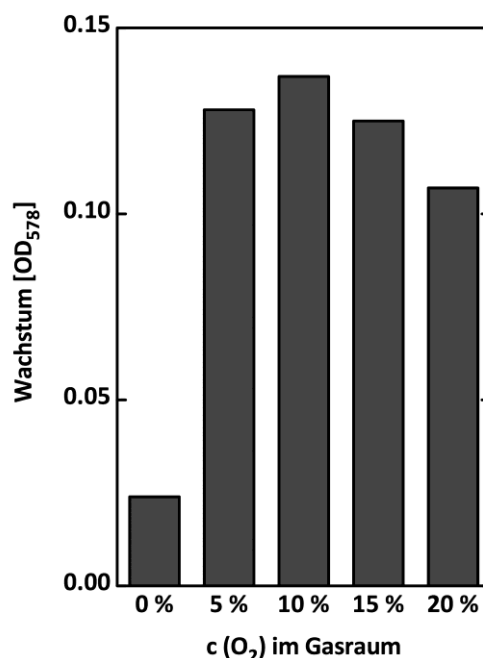
Inkubation erfolgte auf einem Schüttler ( $180 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ) für 24 h bei  $28^\circ\text{C}$  in verschlossenen Kultivierungsflaschen, Medium wurde anaerobisiert und anschließend erfolgte die Zugabe von definierten  $\text{O}_2$ -Konzentrationen in die Gasphase

Zur Klärung in welchem Bereich das Redoxpotential von O<sub>2</sub>-angereichertem Medium liegt, wurde Kultivierungsmedium von *S. multivorans* zunächst anaerobisiert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen an Sauerstoff im Gasraum für 24 h inkubiert. Danach erfolgte die Messung des Redoxpotentials, die in Abbildung 19 dargestellt ist. Das Redoxpotential von anaerobem Medium lag bei zirka +70 mV und stieg mit zunehmender O<sub>2</sub>-Konzentration an. Ab einer Sauerstoffkonzentration im Gasraum von 200 µM lag E<sub>SHE</sub> bei +230 mV. Dabei entspricht die Konzentration von 200 µM an gelöstem Sauerstoff ca. 15 % O<sub>2</sub> im Gasraum (250 µM O<sub>2</sub> ca. 19 % O<sub>2</sub>) der verschlossenen Kultivierungsflaschen.

## 3.2. Wachstum mit Sauerstoff

### 3.2.1. Einfluss der O<sub>2</sub>-Konzentration auf das Wachstum

Es sollte untersucht werden, ob das *S. multivorans* in Anwesenheit von Sauerstoff überlebensfähig und zum Wachstum befähigt ist. Im Gasraum von geschlossenen Kultivierungsflaschen wurden definierte Sauerstoffkonzentrationen zwischen 0 und 20 % eingestellt. Dem Medium wurde 40 mM Pyruvat als Substrat zugesetzt.

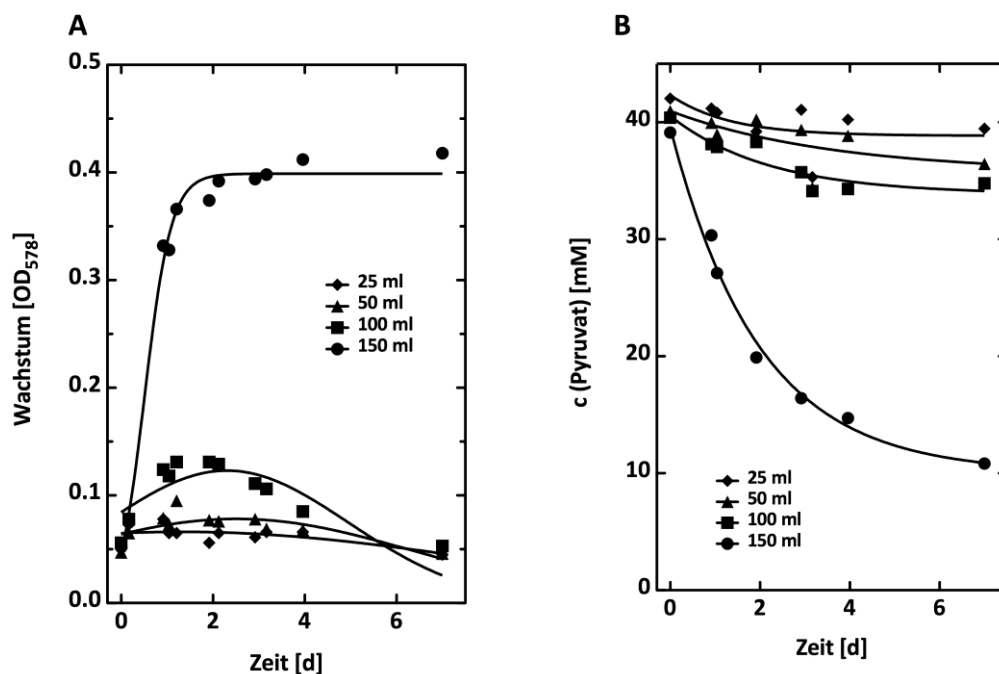


**Abbildung 20. Wachstum von *S. multivorans* auf 40 mM Pyruvat mit verschiedenen Konzentrationen an Sauerstoff in der Gasphase**

Es wurde 10 ml Medium in gasdicht verschlossenen Serumflaschen mit 200 ml Gesamtvolumen verwendet. Dargestellt sind die erreichten OD<sub>578</sub> nach 4 Tagen Kultivierung (Mittelwerte aus 2 Parallelen). 10 % Inokulum, OD<sub>578</sub> nach Animpfen betrug 0,04; Kultivierung bei 28 °C und 130 U·min<sup>-1</sup>

Abbildung 20 zeigt die Zunahmen der optischen Dichten der entsprechenden Kulturen nach 4 Tagen Kultivierung. Darauf ist zu erkennen, dass es in Abwesenheit von Sauerstoff nur zu einer geringen Erhöhung der  $OD_{578}$  kam. Wenn Sauerstoff im Gasraum vorhanden war, konnte eine deutliche Zunahme der optischen Dichte verzeichnet werden. Die maximale  $OD_{578}$  lag bei 10 %  $O_2$  im Gasraum und fiel bei höheren  $O_2$ -Konzentrationen wieder ab, jedoch selbst bei 20 % Sauerstoff konnte noch Wachstum beobachtet werden. Die  $OD_{578}$  zum Beginn des Versuches beliefen sich durchschnittlich auf 0,058.

Da Wachstum von *S. multivorans* auch in Anwesenheit von 20 % Sauerstoff im Gasraum zu beobachten war, sollte geklärt werden, welchen Einfluss unterschiedliche Kultivierungsbedingungen auf die Sauerstofftoleranz des Organismus haben. Dafür wurde das Verhältnis von Gasvolumen zu Mediumvolumen bei ansonsten gleichen Bedingungen variiert. Verschlussene 250 ml-Flaschen wurden mit anaerobisiertem Medium folgender Volumina befüllt: 25 ml, 50 ml, 100 ml und 150 ml. Die  $N_2$ -Gasphase wurde anschließend durch sterile Luft ersetzt. Wachstum und Verbrauch an Pyruvat wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen verfolgt und sind in Abbildung 21 dargestellt.



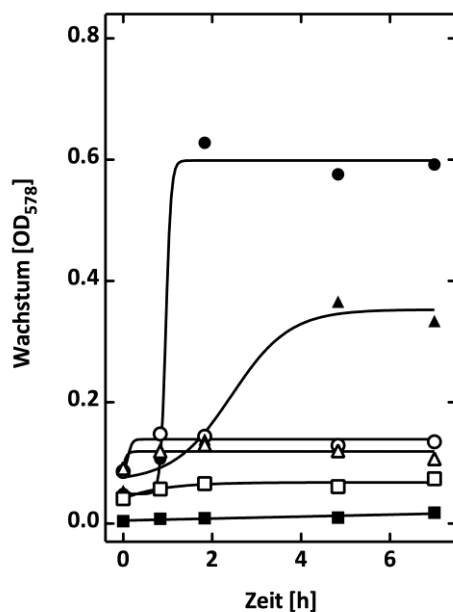
**Abbildung 21. Einfluss des Medienvolumens auf das Wachstum von *S. multivorans* mit Pyruvat und Sauerstoff in geschlossenen 250 ml Kultivierungsgefäßen**

(A) optische Dichte, (B) Pyruvatkonzentration; Volumen des Mediums (◆) 25 ml, (▲) 50 ml, (■) 100 ml, (●) 150 ml; Kulturen wurden bei 28 °C kultiviert und bei 130  $U \cdot min^{-1}$  geschüttelt; Inokulum 10 %



Deutliches Wachstum, gekennzeichnet durch eine OD-Zunahme auf 0,42 ( $\Delta OD_{578} = 0,366$ ), war nur in der Kultur mit einem Flüssigkeit zu Gasphase-Volumenverhältnis von 1:1,7 (150 ml Medium) zu erkennen (Abbildung 21A). Lediglich bei einem Medienvolumen von 100 ml (Verhältnis Flüssigkeit-Gasphasen-Volumen 1:2,5) konnte noch ein geringes Wachstum beobachten werden (maximale  $OD_{578} = 0,132$ ;  $\Delta OD_{578} = 0,075$ ). Allerdings verringerten sich die Wachstumswerte in diesem Fall nach 2 Tagen wieder und erreichten am 7. Tag wieder den Ausgangswert. In den anderen beiden Kulturen (25 ml, 50 ml Medium) konnten nur minimale  $OD_{578}$ -Änderungen festgestellt werden. Analog zum Wachstum wurde nur in der Kultur mit dem größten Medienvolumen eine deutliche Abnahme der Pyruvatkonzentration um zirka 30 mM ermittelt (Abbildung 21B). In den anderen Kulturen (100 ml, 50 ml und 25 ml Kulturvolumen) lag die umgesetzte Pyruvatkonzentration lediglich bei 5 mM, 4 mM bzw. 1 mM.

Weiterhin wurde geprüft, ob das Wachstum tatsächlich aufgrund der Substratkopplung von Pyruvat und Sauerstoff stattfand. Dafür wurden mehrere 250 ml- Flaschen mit 150 ml Medium unter den in Tabelle 10 aufgelisteten Variationen kultiviert.



**Tabelle 10. Unterschiede in Medienzusammensetzung zur Kontrolle des Wachstums von *S. multivorans* mit Pyruvat und Sauerstoff**

Symbol	Pyruvat <sup>1</sup>	Sauerstoff <sup>2</sup>	<i>S. multivorans</i> <sup>3</sup>
●	+	+	+
○	-	+	+
▲	+	-	+
△	-	-	+
■	+	+	-
□	-	-	-

+ vorhanden, - nicht zugegeben

<sup>1</sup> eingesetzte Konzentration betrug 40 mM

<sup>2</sup> N<sub>2</sub> im Gasraum durch sterile Luft ersetzt

<sup>3</sup> Inokulum betrug 10 % (V/V)

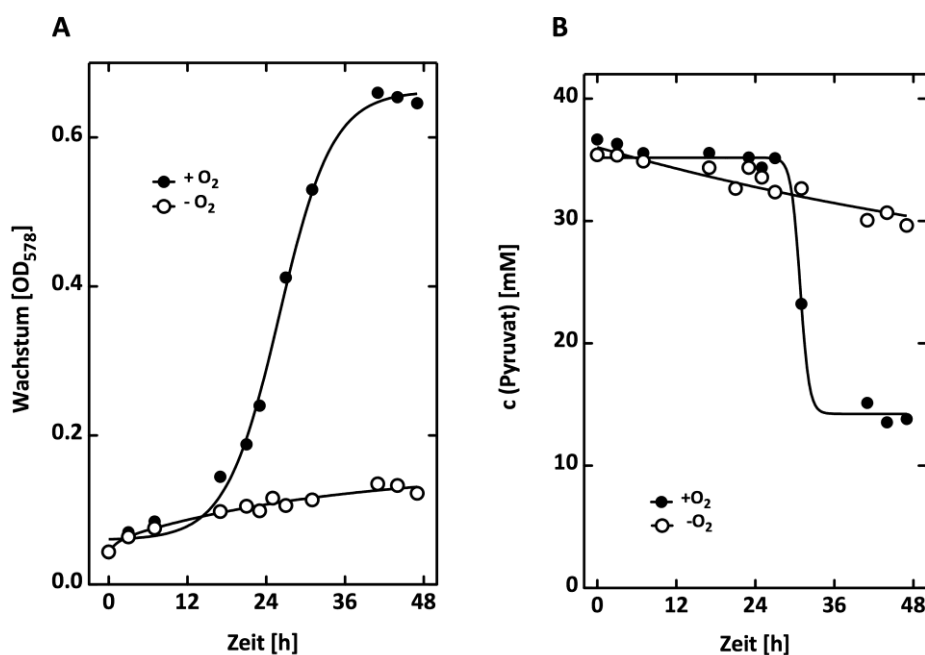
**Abbildung 22. Kontrollversuch Wachstum von *S. multivorans* auf Pyruvat und Sauerstoff**

Legende (Medienzusammensetzung) siehe Tabelle 10 neben der Abbildung; Mediumvolumen: 150 ml, Gasraum: 100 ml, gasdicht verschlossen; Kultivierungsbedingungen: 28 °C, 170 U·min<sup>-1</sup>, 10 % Inokulum

Der Versuch zeigte, dass in der Kombination Pyruvat,  $O_2$  und Inokulum die Zelldichte ( $OD_{578}$ ) um 0,54 zunahm (Abbildung 22). Fehlte der Sauerstoff, erhöhte sich die  $OD_{578}$  noch um 0,31. Allerdings wurde dieser Wert erst nach 5 Tagen erreicht anstatt nach 2 Tagen bei der Kombination von Pyruvat,  $O_2$  und Zellen. In den weiteren Variationen der Versuchsbedingungen ohne Sauerstoff bzw. Inokulum (siehe Tabelle 10) konnten nur kleine Änderungen des Wachstums ermittelt werden, da dort die Zunahme der Zelldichten unter 0,05 ( $OD_{578}$ ) lag.

### 3.2.2. Wachstum mit Pyruvat und Sauerstoff

Die Stimulierung des Wachstums mit Pyruvat durch  $O_2$  (Abbildung 22) lässt darauf schließen, dass Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden kann. Dies sollte in folgenden Versuchen überprüft werden. Das Wachstum in anaerobisiertem Medium, das 40 mM Pyruvat enthielt, zum einem in sauerstofffreiem Gasraum (100 %  $N_2$ , ○), zum anderen in Anwesenheit von 10 % Sauerstoff im Gasraum (●) ist in Abbildung 23A zu sehen.



**Abbildung 23. Wachstumsverlauf von *S. multivorans* mit Sauerstoff als Substrat**

Medium mit 40 mM Pyruvat und 10 %  $O_2$ /90 %  $N_2$  (●) oder 100 %  $N_2$  (○) im Gasraum. (A) Verlauf der optischen Dichte, (B) Pyruvatverbrauch; Kultivierung bei 28 °C und  $170 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 % Inokulum, gasdicht verschlossene Kultivierungsgefäße; Volumen Medium: 100 ml, Gasraum 120 ml

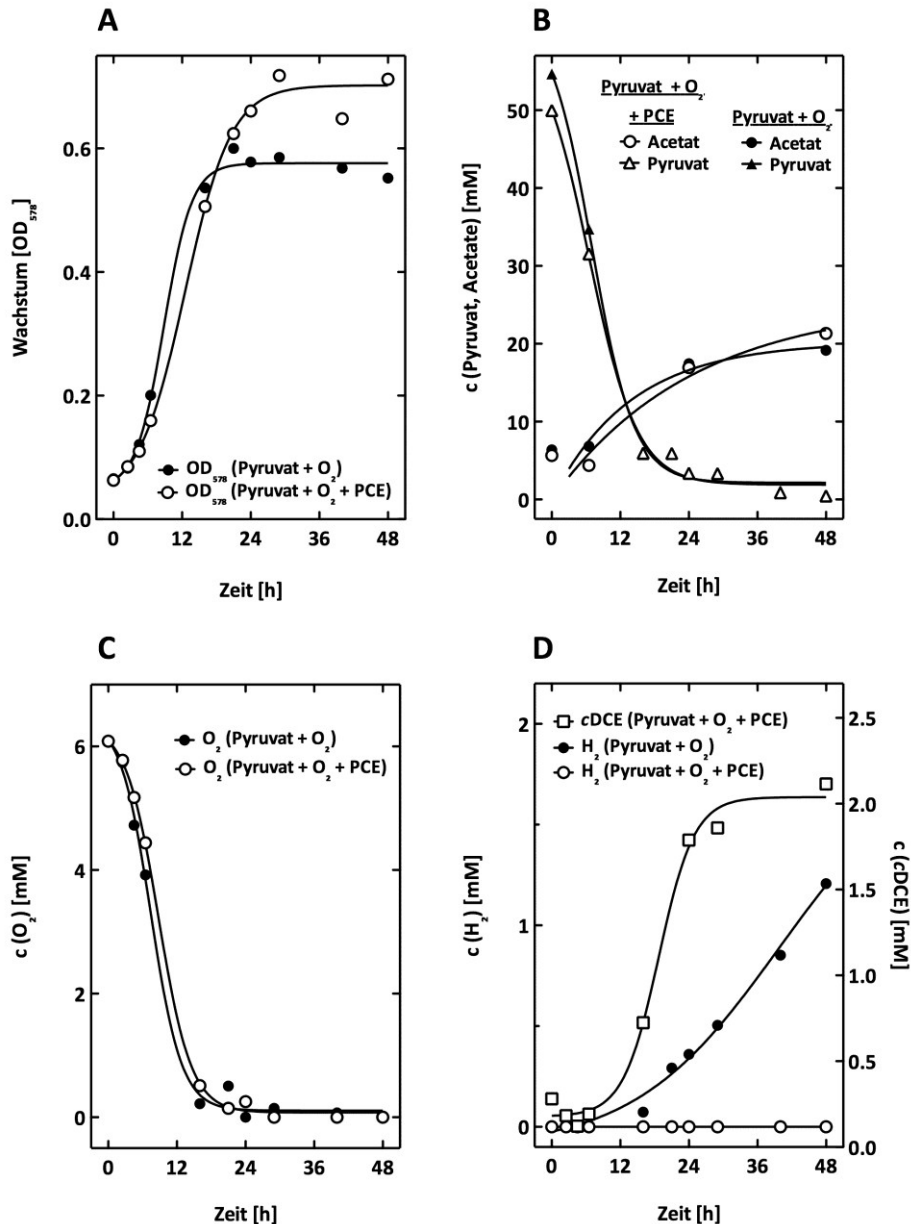
Die berechnete Sauerstoffkonzentration im Gasraum betrug dabei ca. 5 mM. Während bei Abwesenheit von O<sub>2</sub> lediglich ein  $\Delta OD_{578}$  von 0,05 erreicht wurde, erlangte *S. multivorans* mit 10 % O<sub>2</sub> eine optische Dichte von 0,63 ( $\Delta OD_{578} = 0,54$ ). Gleichzeitig wurden bis zum Ende des Wachstumsversuches zirka 22 mM Pyruvat (Abbildung 23B, ●) verbraucht, während die Kultur ohne Sauerstoff im Gasraum (Abbildung 23B, ○) im gleichen Zeitraum nur 5 mM Pyruvat umsetzte. Unter der Annahme, dass O<sub>2</sub> im Gasraum komplett verbraucht wurde, ergab sich ein Umsatz von 4 mol Pyruvat pro 1 mol O<sub>2</sub>.

### 3.2.3. Wachstum mit Pyruvat, Sauerstoff und PCE

Die reduktive Dechlorierung von PCE ist bisher nur unter anaeroben Bedingungen beobachtet worden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Sauerstoff auf Wachstum und Dechlorierung von PCE näher untersucht. Der Versuch wurde am Lehrstuhl für Limnologie (Institut für Ökologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) durchgeführt. Hierfür wurden dem Medium 40 mM Pyruvat und 6 mM O<sub>2</sub> (ca. 10 % O<sub>2</sub>) (Abbildung 24, ●) als Wachstums-substrate zugegeben und einem Teil der Kulturen zusätzlich 10 mM PCE (Abbildung 24, ○). In diesem Wachstumsversuch wurde der Verlauf der optischen Dichte, Pyruvatkonzentration, der Gehalt an Sauerstoff und Wasserstoff sowie cDCE als Produkt aus dem PCE-Abbau verfolgt (Abbildung 24). Als Vorkulturen dienten Kulturen, die bereits über einen längeren Zeitraum in dem entsprechenden Medium kultiviert wurden.

Das Wachstum in beiden Medien unterschied sich in der maximalen Zelldichte ( $OD_{578}$ ), die in der stationären Phase erreicht wurde (Abbildung 24A). Diese lag bei den Kulturen, denen PCE zugesetzt wurde, nach 25 h bei zirka 0,7 ( $\Delta OD_{578} 0,64$ ). Weiterhin zeigten sie eine um 3 h länger andauernde logarithmische Wachstumsphase. In nicht PCE-haltigem Medium erreichten die Kulturen nach 22 h eine maximale optische Dichte von 0,6 ( $\Delta OD_{578} 0,54$ ). In beiden Medien konnte eine ähnlich lange Verzögerungsphase von ungefähr 6 Stunden, jedoch unterschiedliche maximale Wachstumsraten festgestellt werden. Einhergehend mit dem Wachstum von *S. multivorans* kam es zu einer Verringerung der O<sub>2</sub>-Konzentration im Gasraum der Kulturen (Abbildung 24C). Zum Beginn der stationären Wachstumsphase konnte im Gasraum der Kulturflaschen kein Sauerstoff mehr nachgewiesen werden. Das entsprach einem Verbrauch von 6,3 mM bzw. 8 % O<sub>2</sub>. Nachdem der Sauerstoff in den Medien ohne PCE verbraucht war, kam es zur Bildung von Wasserstoff (Abbildung 24D). Die Wasserstoffkonzentration stieg ab diesen Zeitpunkt stetig bis zu einem maximalen Wert von

1,3 mM (2 %) an. Der Abbau von PCE und damit die Bildung von cDCE setzten nach 6 Stunden ein (Abbildung 24D). Zu diesem Zeitpunkt war die Sauerstoffkonzentration im Gasraum auf 5,2 mM (6 %) gesunken.



**Abbildung 24. Wachstum von *S. multivorans* mit 40 mM Pyruvat und 10 % Sauerstoff ohne PCE (●) bzw. unter Zusatz von 10 mM PCE (○)**

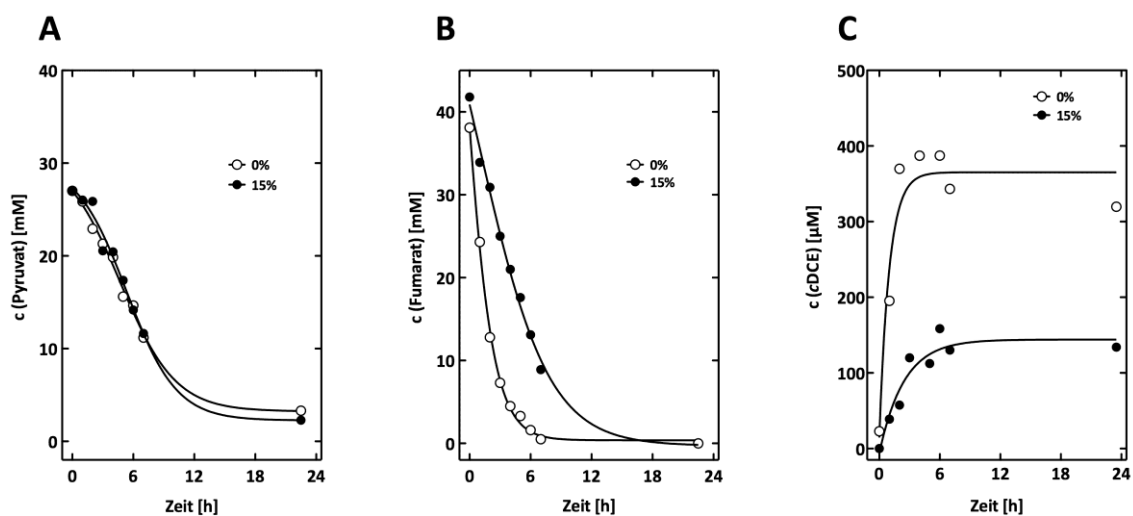
(A) Verlauf der optischen Dichte, (B) Pyruvat- und Acetatkonzentration im Medium, (C) O<sub>2</sub>-Konzentration im Gasraum, (D) H<sub>2</sub>-Konzentration im Gasraum, cDCE-Konzentration im Medium; Kultivierung bei 28 °C, Kulturen wurden bei 190 U·min<sup>-1</sup> geschüttelt, 10 % Inokulum, gasdicht verschlossene Serumflaschen

Die Pyruvatkonzentration (Abbildung 24B) sank nach dem Animpfen innerhalb von 16 h in beiden Kulturen auf ca. 6 mM und war nach 48 h vollständig verbraucht. Der Sauerstoff im Gasraum war in beiden Kulturen nach 16 h völlig verbraucht. Nachdem die O<sub>2</sub>-Konzentration

in der PCE-freien Kultur auf null gesunken war, kam es zur Bildung von  $H_2$ . Das deutet darauf hin, dass in dieser Kultur Reduktionsäquivalente aus dem Pyruvatabbau zur Bildung von Wasserstoff genutzt wurden, da sie weder auf Sauerstoff noch auf PCE übertragen werden konnten. Einen wichtigen Hinweis auf die aktiven Stoffwechselwege von *S. multivorans* beim Umsatz von Sauerstoff in Anwesenheit von Pyruvat lieferte die Bestimmung von  $CO_2$ , Acetat und Lactat. In den beiden Kulturen kam es zur Bildung von Acetat (Abbildung 24B). Zum Abschluss des 48-stündigen Experimentes konnten bei Pyruvat/ $O_2$ /PCE 21 mM Acetat ( $\Delta 14$  mM) sowie bei Pyruvat/ $O_2$  19 mM ( $\Delta 12$  mM) nachgewiesen werden. Eine Freisetzung von Lactat fand während des gesamten Wachstums beider Kulturen nicht statt. Am Ende des Wachstums konnten bei beiden Substratkombinationen ca. 1,5 mM  $CO_2$  (Konzentration nach dem Animpfen: 1,0 mM  $CO_2$ ) im Gasraum gemessen werden. Allerdings steht eine genaue Bilanzierung der  $CO_2$ -Produktion noch aus.

### 3.2.4. Umsatz von Pyruvat, Fumarat und PCE in Gegenwart von $O_2$

Der Einfluss von Sauerstoff auf den Stoffwechsel von Pyruvat und Fumarat sowie Formiat und PCE wurde in den folgenden Experimenten an ruhenden Zellen von *S. multivorans* untersucht. Der Verbrauch an Pyruvat und Fumarat sowie die Bildung von cDCE sind in Abbildung 25 dargestellt. Der Gasraum der Kultivierungsflaschen enthielt zum einen 15 %  $O_2$ /85 %  $N_2$  (●), zum anderen 100 %  $N_2$  (○).



**Abbildung 25. Umsatz von Pyruvat, Fumarat und Bildung von cDCE unter Sauerstoffeinfluss**

Verbrauch an Pyruvat (A) und Fumarat (B), Bildung von cDCE (C); (●) 15 %  $O_2$ , (○) 0 %  $O_2$  im Gasraum; Zellsuspensionspuffer enthielt entweder 40 mM Pyruvat und 40 mM Fumarat (A, B) oder 40 mM Formiat und 10 mM PCE (C). Kultivierungsbedingungen: 28 °C, 130  $U \cdot min^{-1}$ , 10 % Inokulum

In Abbildung 25A ist zu erkennen, dass Pyruvat in An- (○) und Abwesenheit (●) von Sauerstoff mit nahezu gleicher Rate verbraucht wurde. Die Kulturen zeigten jeweils eine kurze Verzögerungsphase von 1-2 Stunden, in der Pyruvat mit verringerter Rate umgesetzt wurde. Im Gegensatz dazu startete die Fumaratverwertung ohne Verzögerung. Zwar wurde Fumarat in beiden Kulturen vollständig verbraucht, allerdings in Gegenwart von O<sub>2</sub> mit geringerer Umsatzrate.

In der Bildung von cDCE (Abbildung 25C) war ein größerer Einfluss von Sauerstoff als bei dem Fumaratverbrauch zu beobachten. Zum einen lag die gebildete Gesamtkonzentration an cDCE bei dem Versuch ohne O<sub>2</sub> mehr als doppelt so hoch (400 µM cDCE) wie unter Zugabe von O<sub>2</sub> (180 µM cDCE). Zum anderen waren deutliche Unterschiede in der Bildungskinetik des Endproduktes aus dem PCE-Abbau zu sehen (Abbildung 25C). Unter Einfluss von Sauerstoff wurde cDCE mit einer maximalen Rate von 26 µM·h<sup>-1</sup> freigesetzt und war damit gegenüber dem O<sub>2</sub>-freiem System um 85 % reduziert (174 µM·h<sup>-1</sup>). Offensichtlich wird die Organohalid-Respiration deutlich stärker durch Sauerstoff gehemmt als der Verbrauch von Pyruvat oder Fumarat.

### 3.2.5. Enzyme des O<sub>2</sub>-Stoffwechsels

#### 3.2.5.1. Sauerstoff entgiftende Enzyme

Vorkommen in Sauerstoff-haltigen Habitaten bedeutet für alle dort lebenden Organismen, dass sie zellschädigenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt sind. Zur Entgiftung dieser Verbindungen sind in der Natur einige Enzymsysteme wie Katalasen oder Peroxidasen entwickelt worden. Es wurde untersucht, ob Enzyme, die schädliche O<sub>2</sub>-Spezies entgiften, in *S. multivorans* vorkommen. Die in Zellextrakten von *S. multivorans* gemessenen Aktivitäten der NADPH-Peroxidase, Katalase, NADH-Oxidase und Superoxid-Dismutase sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die Kultivierung erfolgte dabei mit Pyruvat, Fumarat und Sauerstoff.

**Tabelle 11. Aktivitäten der Katalase, NADPH-Peroxidase und Superoxid-Dismutase in *S. multivorans* bei der Kultivierung mit und ohne Sauerstoff**

O <sub>2</sub> [%] im Gasraum	Katalase [nkat/mg]	NADPH- Peroxidase [nkat/mg]	NADH-Oxidase [nkat/mg]	Superoxid-Dismutase [nkat/mg]
0	0	0,03	0,08	0,8
10	0,1	0,1	0,15	0,6

Es konnten alle vier Enzyme im Organismus nachgewiesen werden (Tabelle 11). Allerdings lagen die gemessenen spezifischen Enzymaktivitäten (Katalase, NADPH-Peroxidase, NADH-Oxidase) teilweise deutlich unter 1 nkat/mg. NADPH-Peroxidase, NADH-Oxidase und Superoxid-Dismutase waren sowohl in O<sub>2</sub>-haltigem als auch O<sub>2</sub>-freiem Medium aktiv. Katalase-Aktivität konnte nur in Zellen aus der Kultivierung in Anwesenheit von Sauerstoff gezeigt werden.

Da zum Zeitpunkt des Anfertigen der vorliegenden Arbeit die Genomsequenz von *S. multivorans* nicht vorlag, können keine Aussagen über die Genausstattung in Hinblick auf ROS-entgiftende Enzyme getroffen werden.

### **3.2.5.2. Aktivität der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase**

Die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) ist ein Schlüsselenzym in der anaeroben Pyruvatverwertung und katalysiert die Bildung von CO<sub>2</sub> und Acetyl-CoA aus Pyruvat. Es wurden die Aktivitäten der PFOR in Zellen gewachsen in An- und Abwesenheit von Sauerstoff im Gasraum der Kultivierungsflaschen bestimmt. Diese Messungen lieferten Hinweise darauf, inwiefern der Pyruvatumsatz durch O<sub>2</sub> beeinflusst wurde und ob weitere Enzymsysteme zum Pyruvatabbau vorhanden sind. Bei anaerob kultivierten Zellen lag die PFOR-Aktivität bei durchschnittlich 2,1 nkat/mg, während in mit 10 % O<sub>2</sub> gewachsene Zellen nur noch 1,2 nkat/mg gemessen worden. Somit reduzierte Sauerstoff die Aktivität der PFOR um 43 %.

### **3.2.5.3. Aktivität der $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase**

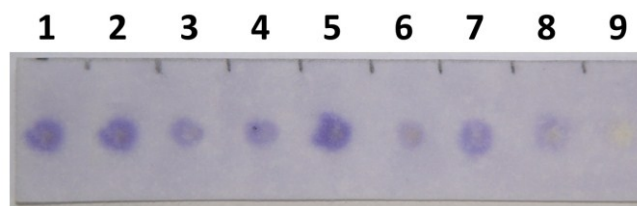
Die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase ( $\alpha$ KGDH) ist ein Enzym des Tricarbonsäure-Zyklus (TCC) und katalysiert die Reaktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA. Eine aktive  $\alpha$ KGDH gibt Hinweise auf das Vorkommen eines geschlossenen TCCs in *S. multivorans* und damit auch einen möglichen vollständigen oxidativen Abbau von Pyruvat.

Es wurde eine Aktivitätsmessung der  $\alpha$ KGDH in Zellextrakten aerob gewachsener Kulturen (40 mM Pyruvat / 10 % O<sub>2</sub>) durchgeführt und mit Zellextrakten von *E. coli* verglichen (Mineralmedium mit 10 mM Glucose, aerob). Es konnten folgende Aktivitäten gemessen werden: *S. multivorans* (0,0 nkat/mg); *E. coli* (0,3 nkat/mg).

### 3.2.5.4. Oxidase-Nachweis

Ein wichtiger Bestandteil der aeroben Atmungskette der meisten aeroben Organismen ist die Cytochrome *c*-Oxidase, da dadurch eine maximale Ausbeute an ATP bei Reduktion von Sauerstoff erzielt werden kann. Der Oxidase-Schnelltest liefert Hinweise darauf, ob eine Cytochrome *c*-Oxidase im Organismus vorkommt und damit auch auf die Beschaffenheit einer Atmungskette.

Das Vorkommen einer Cytochrome *c*-Oxidase in *S. multivorans* konnte mittels dieses Schnelltests nachgewiesen werden (Abbildung 26). Die Anwesenheit der Oxidase schien unabhängig vom verwendeten Substrat zu sein. Allerdings war bei den Substraten Pyruvat/O<sub>2</sub> und Formiat/PCE (Abbildung 26, Abschnitte 1 und 5) die schnellste und stärkste Reaktion zu sehen. Währenddessen konnte bei Pyruvat/Nitrat (Abbildung 26, Abschnitt 6) nur ein schwaches, dennoch positives Signal beobachtet werden.



**Abbildung 26. Oxidase-Test in *S. multivorans* gewachsen auf verschiedenen Substraten**

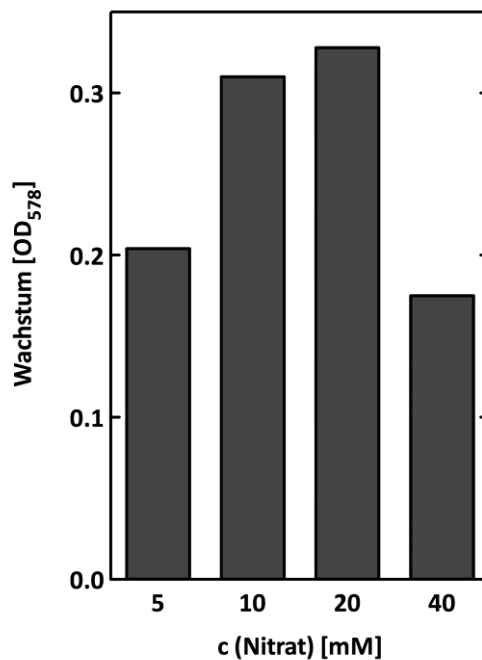
*S. multivorans* (1) Formiat/PCE, (2) Pyruvat/Fumarat, (3) Fumarat, (4) Pyruvat/PCE, (5) Pyruvat/O<sub>2</sub>, (6) Pyruvat/Nitrat, (7) *S. halofer* Pyruvat/Fumarat, (8) Positivkontrolle *Pseudomonas syringae*, (9) Negativkontrolle *Escherichia coli*

## 3.3. Wachstum mit alternativen Elektronenakzeptoren

### 3.3.1. Nitrat als Elektronenakzeptor

Wie bereits gezeigt wurde, ist Wachstum von *S. multivorans* mit Pyruvat als einziges Substrat nicht möglich (siehe Abschnitt 3.2.1.). Neben PCE, Fumarat und Sauerstoff kann auch Nitrat als Elektronenakzeptor von *S. multivorans* genutzt werden. In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, inwieweit alternative Elektronenakzeptoren den Abbau von PCE beeinflussen. Die Abbildung 27 zeigt das Wachstum von *S. multivorans* im Medium, welches 40 mM Pyruvat als Elektronendonator und verschiedene Konzentrationen von Nitrat als Elektronenakzeptor enthält. Die optischen Dichten der Kulturen lagen nach 5 Tagen zwischen 0,18 (40 mM Nitrat) und 0,33 (20 mM Nitrat). Die pH-Werte lagen dabei zwischen 7,1 (40 mM Nitrat) und 7,4 (20 mM Nitrat). Somit konnte die höchste Ausbeute an Zellmaterial mit 40 mM Pyruvat und 20 mM Nitrat als Energiesubstrate erreicht werden.

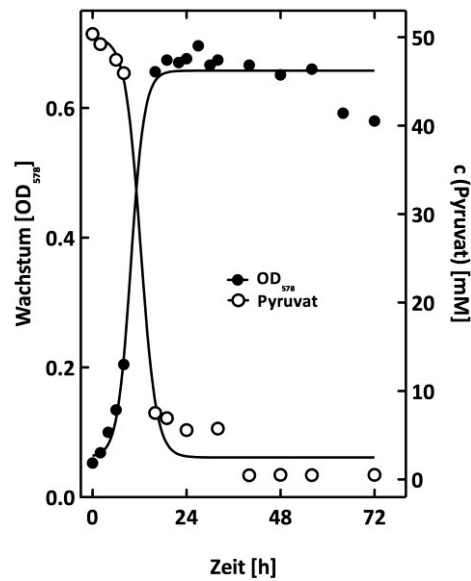




**Abbildung 27. Wachstum von *S. multivorans* mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen**

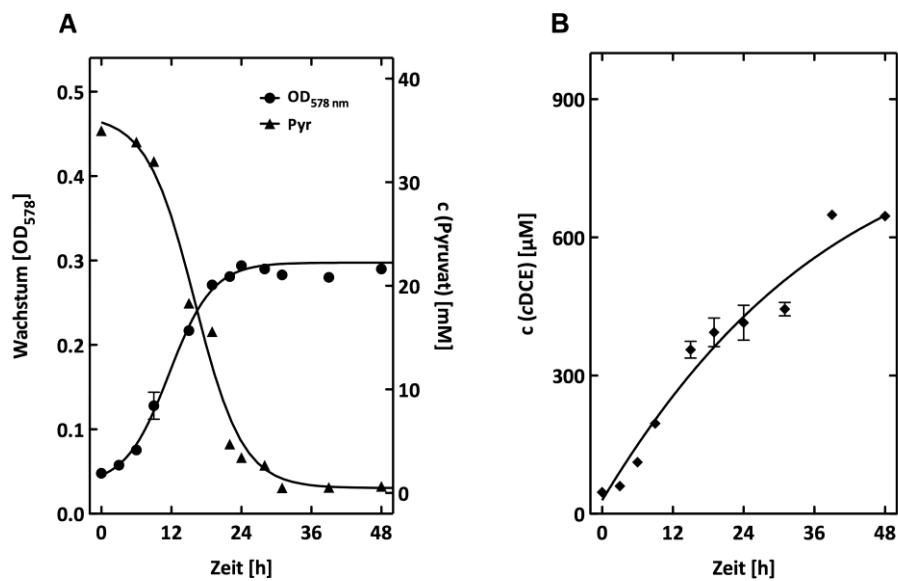
Substrate: 40 mM Pyruvat als Elektronendonator, Nitrat als Elektronenakzeptor; OD<sub>578</sub> nach 5 Tagen Kultivierung bei 28 °C und 130 U·min<sup>-1</sup>; Die OD<sub>578</sub> nach dem Animpfen betrug 0,05.

Im Folgenden sollte der Wachstumsverlauf von *S. multivorans* in Medium, das 40 mM Pyruvat und 20 mM Nitrat enthielt, näher untersucht werden. Der zeitliche Verlauf von Zelldichte und Substratkonzentration sind in Abbildung 28 dargestellt. Enthielt das Kulturmedium Nitrat als Elektronenakzeptor konnte eine Zunahme der OD<sub>578</sub> bei gleichzeitigem Pyruvatverbrauch gemessen werden. Nitrat wurde dabei unvollständig über Nitrit zu Ammonium reduziert. Nach 24-stündiger Kultivierung lagen im Medium ca. 10 mM Nitrit und 5 mM Ammonium vor. Abbildung 29 zeigt einen Wachstumsverlauf unter folgenden Bedingungen: 40 mM Pyruvat, 20 mM Nitrat und zusätzlich 10 mM PCE. Im Unterschied zum PCE-freien Medium konnte hier nur eine geringere maximale OD<sub>578</sub> erreicht werden. Wachstumsrate und Umsatzrate von Pyruvat waren ebenfalls niedriger als bei der Kultivierung mit Pyruvat/Nitrat. Der Gehalt an cDCE im Medium nahm über die gesamte Kultivierungsdauer zu (Abbildung 29B). Damit konnte gezeigt werden, dass reduktive Dechlorierung von PCE und Nitratreduktion mit Pyruvat als Elektronendonator gleichzeitig stattfanden.



**Abbildung 28. Wachstum von *S. multivorans* mit Pyruvat und Nitrat als Substrate**

Dargestellt sind  $OD_{578 \text{ nm}}$  (●) und Pyruvatkonzentration (○) in Abhängigkeit von der Zeit; Kultivierung bei 28 °C unter Schütteln bei 130 U·min<sup>-1</sup>; Inokulum: 10 %



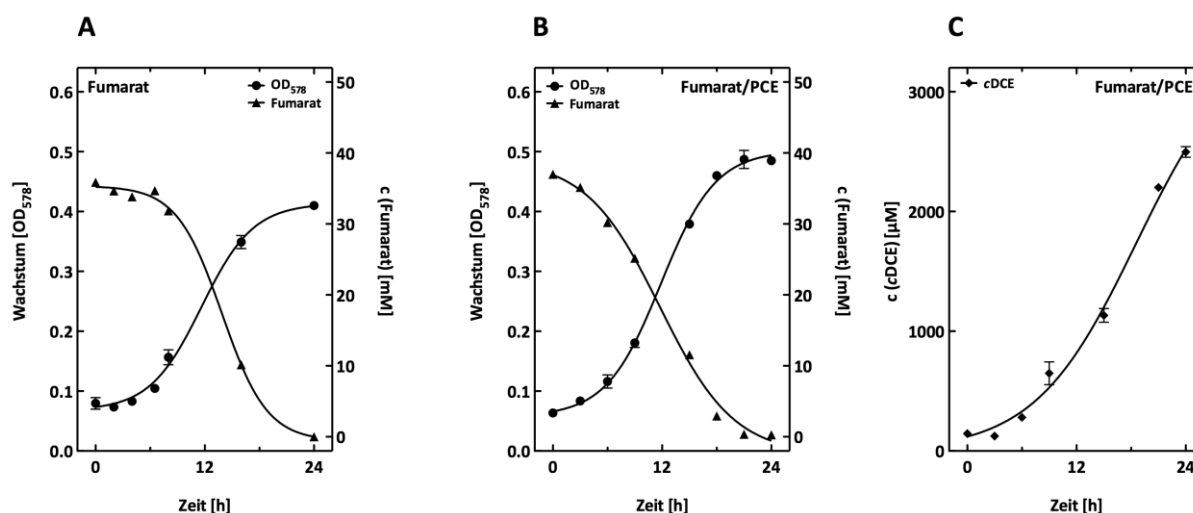
**Abbildung 29. Wachstumskinetik mit 40 mM Pyruvat, 20 mM Nitrat und 10 mM PCE**

Dargestellt sind (A) Wachstum,  $OD_{578}$  (●), Pyruvat (▲) und (B) Bildung von cDCE (◆) in Abhängigkeit von der Zeit; Kultivierung bei 28 °C unter Schütteln bei 130 U·min<sup>-1</sup>; Inokulum: 10 %; **Pyr**: Pyruvat

### 3.3.2. Fumarat als einziges Substrat

*Sulfurospirillum multivorans* ist in der Lage, Fumarat als Energiesubstrat zu nutzen. Bei Verwendung dieses Substrates wurde eine maximale  $OD_{578}$  von 0,41 erreicht, wobei die

Kultur nach 24 h in die stationäre Wachstumsphase übergang (Abbildung 30). Einhergehend mit der Zunahme der Zelldichte wurde Fumarat vollständig verbraucht.



**Abbildung 30. Wachstum von *S. multivorans* mit Fumarat als Energiesubstrat**

Dargestellt sind  $OD_{578 \text{ nm}}$  (●), Fumarat-Konzentration (○) und (◆) cDCE-Konzentration in Abhängigkeit der Zeit. Das Medium wurde anaerobisiert und enthielt folgende Substrate: (A) 40 mM Fumarat, (B, C) 40 mM Fumarat, 10 mM PCE. Die Kultivierung von *S. multivorans* erfolgte in geschlossenen Kulturflaschen bei 28 °C und 130  $\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$ . Inokulum: 10 %

Zusätzlich wurde das Wachstum mit den Substraten Fumarat und PCE untersucht (Abbildung 30B, C). Nach dem Animpfen der Kultur begann ohne Verzögerung der Verbrauch an Fumarat während die Bildung von cDCE, als Produkt der Dechlorierung von PCE, nach einer Verzögerung einsetzte. Somit konnte die gleichzeitige Nutzung von Fumarat und PCE als Substrate nachgewiesen werden.

### 3.4. Zusammenfassung der Wachstumsparameter

Die aus den Kultivierungen unter verschiedenen Substratkombinationen ermittelten Wachstumsparameter maximale Zelldichte,  $\mu_{\text{max}}$  und maximale Umsatzraten der Substrate sind in Tabelle 12 vergleichend aufgelistet.

Bei der Substratkombination Pyruvat/ $\text{O}_2$  und Pyruvat/ $\text{O}_2$ /PCE konnten eine ähnliche maximale Zelldichte und Substratumsatzraten (Pyruvat und  $\text{O}_2$ ) gemessen werden. Lediglich in der maximalen Wachstumsrate konnte ein größerer Unterschied beobachtet werden. Bei der Kultivierung mit Fumarat  $\pm$  PCE zeigten sich ebenfalls nur geringe Unterschiede in den ermittelten Wachstumsparametern maximale Zelldichte, maximale Wachstumsrate und Fumaratumsatz. Bei der Substratkombination Pyruvat/Nitrat offenbarten sich jedoch

deutliche Abweichungen in den Wachstumsparametern zwischen PCE-freien und PCE-haltigem Medium. So erreichte die Kultur ohne PCE im Medium eine mehr als doppelt so große maximale OD<sub>578</sub>, Pyruvatumsatzrate sowie Wachstumsrate als in PCE-freien Medium. Die Bildungsrate von cDCE unterschieden sich in den Kultivierungen mit Pyruvat/O<sub>2</sub>/PCE und Fumarat/PCE nur geringfügig. Dem gegenüber wurde cDCE in Pyruvat/Nitrat/PCE mit einer stark reduzierten Rate gebildet.

**Tabelle 12. Zusammenfassung Wachstumsparameter von *S. multivorans* bei verschiedenen Substratkombinationen**

Substrat			max. OD <sub>578</sub>	μ [h <sup>-1</sup> ]	Maximale Umsatzraten [mM·h <sup>-1</sup> ]		
1	2	3			Substrat 1	Substrat 2	Substrat 3 (PCE)
Pyruvat	O <sub>2</sub>		0,6	0,056	3,06	0,42	-
Pyruvat	O <sub>2</sub>	PCE	0,7	0,041	2,75	0,37	0,133
Pyruvat	Nitrat		0,7	0,069	4,8	n. b.	-
Pyruvat	Nitrat	PCE	0,29	0,043	1,91	n. b.	0,038
Fumarat			0,41	0,034	1,91	-	-
Fumarat		PCE	0,49	0,036	1,99	-	0,123

n.b.: nicht bestimmt

-: nicht vorhanden

### 3.5. Langzeitkultivierung von *S. multivorans*

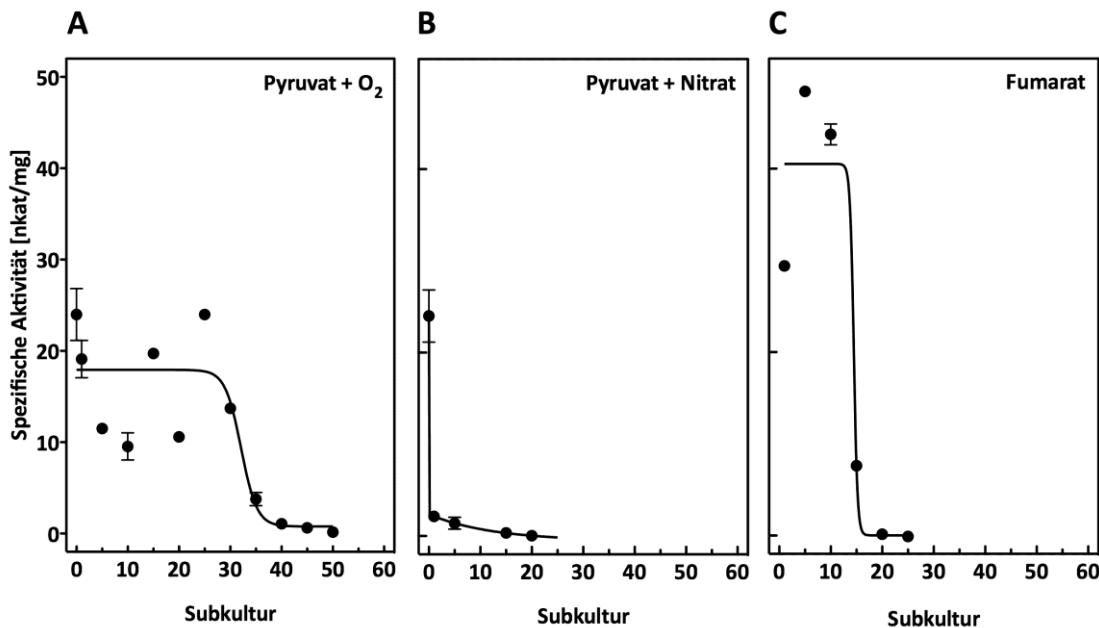
#### 3.5.1. Aktivität der PCE-Dehalogenase

Mit fortschreitender Kultivierung von *S. multivorans* mit den Substraten Pyruvat und Fumarat in Abwesenheit von PCE und TCE erfolgte eine Abnahme der Aktivität und Expression der PCE-Dehalogenase. Diese trat allerdings erst nach einer Kultivierung von mehr als 100 Generationen (entspricht 20 Subkultivierungen) auf (John & Rubick *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern diese Langzeitregulation der PCE-Dehalogenase auch in Anwesenheit anderer Elektronenakzeptoren beobachtet werden kann.

Das Bakterium *S. multivorans* wurde ausgehend von der Stammhaltung mit Formiat/PCE auf Medien mit verschiedenen Wachstumssubstraten (z. B. Pyruvat/Fumarat) 10%ig überimpft. Nachdem Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase, wurde die Kultur auf das gleiche Medium überimpft (jeweils 10 % Inokulum). Jede Kultivierung entsprach dabei einer

Subkultur bzw. Subkultivierung und umfasste dabei 3-4 Generationen. Alle 5 bzw. 10 Subkultivierungen erfolgte die Bestimmung der Aktivität der PCE-Dehlaogenase.

*S. multivorans* wurde auf den Substratkombinationen Pyruvat/O<sub>2</sub>, Pyruvat/Nitrat und Fumarat kultiviert. Zellen aus der Kultivierung mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor und Pyruvat als Elektronendonator zeigten ähnliche maximale spezifische Aktivitäten der PCE-Dehlaogenase (Abbildung 31) wie bei der Kultivierung mit Pyruvat/Fumarat (Abbildung 32). Somit scheint Sauerstoff in dem verwendeten System grundsätzlich keine signifikant negativen Auswirkungen auf die Enzymaktivitäten zu haben.



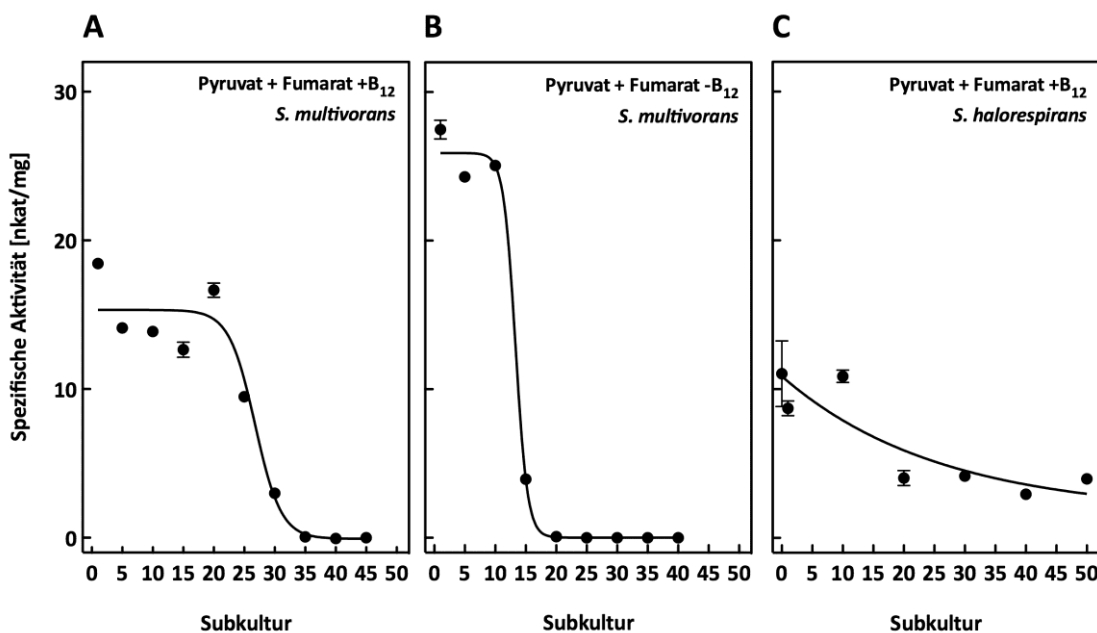
**Abbildung 31. Spezifische Aktivitäten der PCE-Dehalogenase in der Langzeitkultivierung von *S. multivorans* unter verschiedenen Substratkombinationen**

Dargestellt ist der Verlauf der spezifischen Aktivität von PceA über die Zeit (als Anzahl der Subkultivierungen). Kulturen wurden jeweils mit 10 % aus der vorherigen angeimpft. Subkultur 0 entspricht Vorkultur auf Acetat/Formiat/PCE. Verwendete Substrate: (A) Pyruvat/O<sub>2</sub>, (B) Pyruvat/Nitrat, (C) Fumarat; Angegebene Enzymaktivitäten sind Mittelwerte aus 3 Messungen, Kultivierung wurde jeweils einmal durchgeführt.

Im Gegensatz zu Pyruvat/Fumarat erfolgte eine deutliche Abnahme der Enzymaktivität allerdings erst nach mehr als 35 Subkultivierungsschritten bis hin zum Verlust der Aktivität nach 50 Subkultivierungen (Abbildung 31A und Abbildung 32A). Bei Pyruvat/Fumarat war nach 40 Subkultivierungen keine Enzymaktivität mehr messbar. Im Gegensatz dazu, wurde beim Wachstumssubstrat Pyruvat/Nitrat (Abbildung 31) bereits nach dem ersten Überimpfen (Subkultur 1) weniger als 10 % der Ausgangsaktivität der PCE-Dehalogenase bestimmt. Im weiteren Verlauf der Kultivierung konnten bei Subkultur 15 noch 1,4 % der Ausgangsaktivität gemessen werden und in Subkultur 20 war keine Aktivität der PCE-

Dehalogenase mehr nachweisbar. Bei der Kultivierung in Fumarat-haltigem Medium kam es ab Subkultur 10 zu einer Abnahme der Enzymaktivität. Ab Subkultur 25 konnte keine Aktivität mehr nachgewiesen werden (Abbildung 31C). Die Langzeitregulation der PCE-Dehalogenase schien offensichtlich neben Pyruvat/Fumarat auch bei anderen Substraten vorzukommen.

Da die PCE-Dehalogenase als Cofaktor ein Corrinoide enthält, sollte in einem Kontrollexperiment der Einfluss von Vitamin B<sub>12</sub>, das dem Medium zugesetzt wurde, auf die Aktivitäten der PCE-Dehalogenase untersucht werden. Dafür wurde *S. multivorans* ohne Zusatz an Hefeextrakt und Cyanocobalamin und als Vergleich mit komplettem Medium einer Langzeitkultivierung unterzogen. Zusätzlich erfolgte eine Kultivierung des Bakteriums *S. halorespirans* aus der gleichen Gattung, um zu überprüfen, ob die Langzeitregulation artspezifisch ist (Abbildung 32).



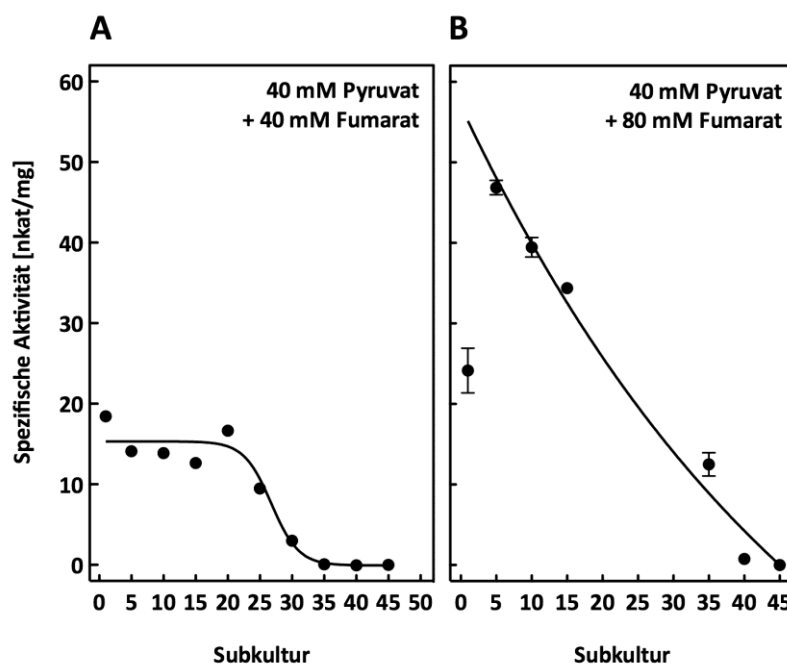
**Abbildung 32. Änderung der spezifischen Aktivität der PCE-Dehalogenase von *S. multivorans* und *S. halorespirans* in der Langzeitkultivierung auf Pyruvat/Fumarat  $\pm$  B<sub>12</sub>**

Dargestellt ist der Verlauf der spezifischen Aktivität von PceA über die Zeit (als Anzahl der Subkultivierungen). Kulturen wurden jeweils mit 10 % aus der vorherigen angeimpft. Subkultur 0 entspricht Vorkultur auf Acetat/Formiat/PCE. Verwendete Substrate: (A) *S. multivorans*, Pyruvat/Fumarat (jeweils 40 mM) mit B<sub>12</sub>; (B) *S. multivorans*, Pyruvat/Fumarat (jeweils 40 mM) ohne B<sub>12</sub> im Medium; (C) *S. halorespirans*, Pyruvat/Fumarat (jeweils 20 mM) mit B<sub>12</sub> im Medium. Angegebene Enzymaktivitäten sind Mittelwerte aus 3 Messungen, Kultivierung wurde jeweils einmal durchgeführt.

Beim Vergleich der Enzymaktivitäten (Abbildung 32) fiel auf, dass es bei Fehlen von Vitamin B<sub>12</sub> im Medium zu einer früheren und schnelleren Abnahme der Aktivität der PCE-Dehalogenase kam (Abbildung 32B). Bereits in der Subkultur 15 waren nur noch 14 % der

Ausgangsaktivität vorhanden und ab Subkultur 25 konnte keine Aktivität mehr bestimmt werden. Bei Pyruvat/Fumarat (komplettes Medium) war dies im Unterschied erst nach 40 Subkultivierungsschritten der Fall. Offensichtlich bedingte das Fehlen von Vitamin B<sub>12</sub> im Medium eine schnellere Abnahme der PceA-Aktivität. Die Signifikanz dieser Abnahme der Enzymaktivität konnte aufgrund der einmalig durchgeführten Langzeitkultivierung nicht überprüft werden. Die Aktivitäten zu Beginn der Kultivierung von *S. halorespirans* lagen unter denen von *S. multivorans*, was jedoch innerhalb der Schwankungsbreite der Messungen lag. Ab Subkultur 20 reduzierte sich die Aktivität auf zirka 35 % der Ausgangsaktivität, blieb allerdings bis zum Abschluss der Kultivierung (Subkultur 50) aktiv. Somit konnte im durchgeführten Untersuchungszeitraum keine Regulation der PCE-Dehalogenase in *S. halorespirans* festgestellt werden.

Da bei der Kultivierung von *S. multivorans* mit Fumarat als alleinigem Substrat im Vergleich zu Pyruvat/Fumarat zuerst eine Erhöhung der Aktivität der PCE-Dehalogenase und dann eine schnellere und frühere Abnahme zu beobachten war, sollte der Einfluss einer höheren Fumaratkonzentration im Medium untersucht werden (Abbildung 33).

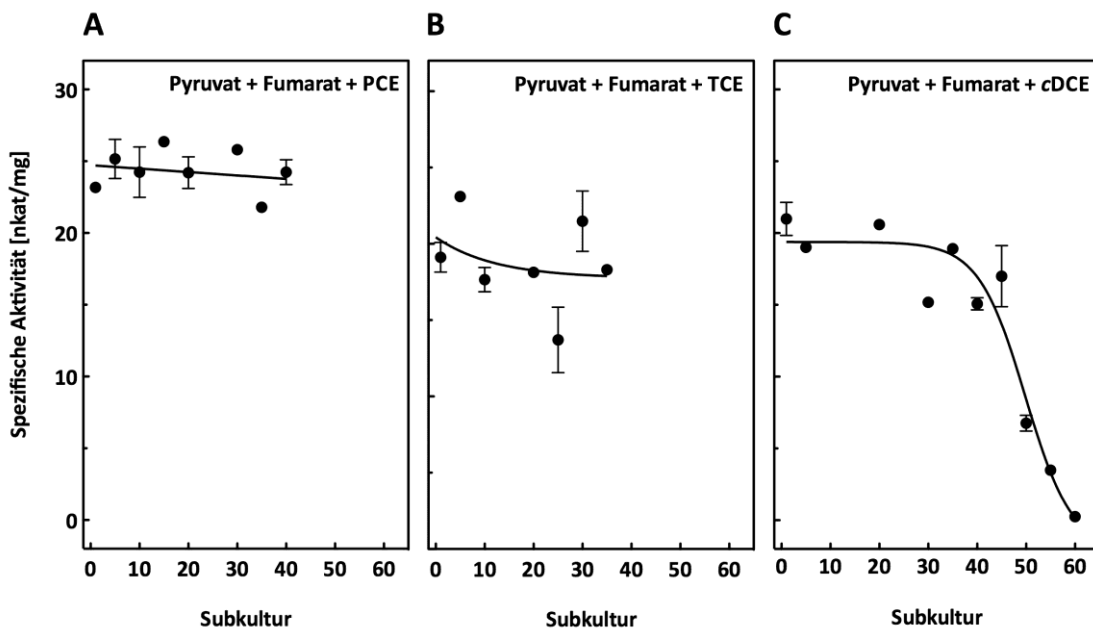


**Abbildung 33. Einfluss der Fumarat-Konzentration auf die Aktivität der PCE-Dehalogenase in der Langzeitkultivierung von *S. multivorans***

Dargestellt ist der Verlauf der spezifischen Aktivität von PceA über die Zeit (als Anzahl der Subkultivierungen). Kulturen wurden jeweils mit 10 % aus der vorherigen angeimpft. Subkultur 0 entspricht Vorkultur auf Acetat/Formiat/PCE. Verwendete Substrate: (A) 40 mM Pyruvat und 40 mM Fumarat, (B) 40 mM Pyruvat und 80 mM Fumarat; Angegebene Enzymaktivitäten sind Mittelwerte aus 3 Messungen, Kultivierung wurde jeweils einmal durchgeführt.

Aus diesem Grund erfolgte der Zusatz von 80 mM Fumarat und 40 mM Pyruvat zum Medium. Die Messung der Enzymaktivitäten zeigte (Abbildung 33B), dass sich diese von der Subkultur 1 zu 5 verdoppelte und danach wieder abnahm. Im Subkultivierungsschritt 40 waren noch 3,1 % der Ausgangsaktivität der PCE-Dehalogenase vorhanden. Erst nach 45 Subkultivierungsschritten war keine Aktivität mehr messbar. Im Vergleich zu 40 mM Fumarat und 40 mM Pyruvat konnte über einen längeren Kultivierungszeitraum eine aktive PCE-Dehalogenase nachgewiesen werden. Inwiefern, es sich hierbei um signifikante Unterschiede handelte, konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht geklärt werden.

Die Abnahme der PCE-Dehalogenase-Aktivität wurde in den bisherigen Untersuchungen nur in Abwesenheit von PCE im Medium beobachtet. Darüber hinaus sollte ein möglicher Einfluss weiterer chlorierter Ethene auf die Enzymaktivität in der Langzeitkultivierung mit Pyruvat und Fumarat untersucht werden (Abbildung 34).



**Abbildung 34. Aktivitäten der PCE-Dehalogenase in der Langzeitkultivierung von *S. multivorans* in Anwesenheit der chlorierten Ethene PCE, TCE oder cDCE**

Dargestellt ist der Verlauf der spezifischen Aktivität von PceA über die Zeit (als Anzahl der Subkultivierungen). Kulturen wurden jeweils mit 10 % aus der vorherigen angeimpft. Subkultur 0 entspricht Vorkultur auf Acetat/Formiat/PCE. Verwendete Wachstumssubstrate: 40 mM Pyruvat, 40 mM Fumarat und (A) 10 mM PCE, (B) 5 mM TCE oder (C) 2,5 mM cDCE; Angegebene Enzymaktivitäten sind Mittelwerte aus 3 Messungen, Kultivierung wurde jeweils einmal durchgeführt.



Als Vergleich diente die Kultivierung mit Pyruvat und Fumarat in Abwesenheit chlorierter Ethene (Abbildung 34A), in der ab Subkultivierungsschritt 30 eine deutlich reduzierte Enzymaktivität gemessen wurde. Erfolgte der Zusatz von PCE und TCE, konnte bis zum Abschluss (Subkultur 40 bzw. 35) keine Reduzierung der Aktivität der PCE-Dehalogenase gemessen werden (Abbildung 34A, B). Dies steht im Einklang damit, dass PCE und TCE dem Enzym als Substrat dienen und dessen Expression induzieren können. Bei der Kultivierung mit cDCE konnte ebenfalls bis zur Subkultur 40 keine Abnahme der Enzymaktivität gemessen werden. Eine weiterführende Kultivierung offenbarte eine Reduzierung der Enzymaktivität ab dem 50. Subkultivierungsschritt und in Subkultur 60 konnten nur noch eine sehr geringe PceA-Aktivität gemessen werden (Abbildung 34C). Das zeigte, dass die Aktivität der PCE-Dehalogenase auch in Anwesenheit eines chlorierten Ethens im Medium reduziert wurde. Jedoch war cDCE kein Substrat für das Enzym.

Eine Zusammenfassung über den Verlust der Aktivität der PCE-Dehalogenase in der Langzeitkultivierung von *S. multivorans* und *S. halorespirans* in Abhängigkeit der verschiedenen Wachstumssubstrate geben Tabelle 13 und Tabelle 14. Dabei wurden die Subkultivierungsschritte aufgelistet, an denen die spezifische Aktivität der PCE-Dehalogenase weniger als 10 % der Aktivität der Subkultur 1 betrug. Eine scheinbar konstitutiv aktive PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* konnte bei Kultivierung in Anwesenheit von PCE und TCE, die von PceA umgesetzt werden, festgestellt werden (Tabelle 14). Fehlten PCE oder TCE im Medium, kam es zur Abnahme und Verlust der Enzymaktivität nach 20 oder mehr Subkultivierungsschritten mit dem entsprechenden Substrat. Offenbar waren die von der PCE-Dehalogenase katalysierten Substrate entscheidend für das Auftreten der Langzeitregulation (Tabelle 13). Eine Ausnahme bildete die Verwendung von Nitrat als Substrat, die zu einem verkürzten Zeitraum der Abnahme der PceA-Aktivität führte.

Weiterhin wurde innerhalb des Kultivierungszeitraumes bei *S. halorespirans* kein Verlust der Enzymaktivität gemessen, was für eine konstitutive Expression von PceA in Abwesenheit von chlorierten Ethenen sprechen könnte (Tabelle 14).

**Tabelle 13. Subkultur mit weniger als 10 % spezifischer Aktivität der PCE-Dehalogenase im Vergleich zu Beginn der Subkultivierung auf den angegebenen Substraten**

Substratkombination						Subkultur [nkat/mg]	
mM		mM		mM		< 10 % <sup>*</sup>	0 % <sup>*</sup>
40	Pyruvat	20	Nitrat			1	20
40	Pyruvat	40	Fumarat		- B <sub>12</sub>	20	25
40	Fumarat					20	25
40	Pyruvat	40	Fumarat			35	40
40	Pyruvat	6,5 <sup>1</sup>	Sauerstoff			40	50
40	Pyruvat	80	Fumarat			40	45
40	Pyruvat	40	Fumarat	2,5	cDCE	60	k. A. <sup>2</sup>

<sup>\*</sup> ausgehend von der Aktivität der PCE-Dehalogenase am ersten Subkultivierungsschritt

<sup>1</sup> entsprechen ca. 10 % O<sub>2</sub> (V/V) im Gasraum

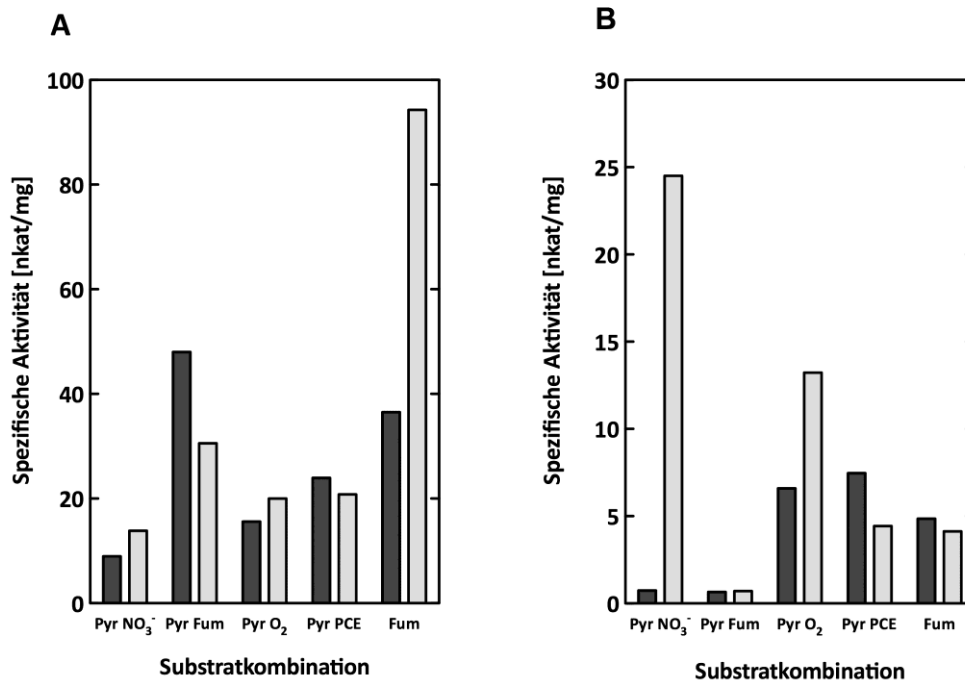
<sup>2</sup> k. A. keine Angabe, da Kultivierung nur bis zur Subkultur 60 durchgeführt wurde

**Tabelle 14. Wachstumssubstrate ohne Verlust der PCE-Dehalogenase-Aktivität im Lauf der Langzeitkultivierung von *S. multivorans* und *S. halorespirans***

Substratkombination						Subkultur
mM		mM		mM		
40	Pyruvat	40	Fumarat	10	TCE	35
40	Pyruvat	40	Fumarat	10	PCE	40
<i>S. halorespirans</i>						
40	Pyruvat	40	Fumarat			50

### 3.5.2. Aktivitäten anderer respiratorischer Enzyme

Wie bereits in den vorherigen Experimenten gezeigt wurde, nahm in Abwesenheit der chlorierten Ethene PCE und TCE die Aktivität der PCE-Dehalogenase erst nach einer langen Kultivierungsdauer ab. Der Zeitraum und Zeitpunkt der Reduzierung und Verlust der Enzymaktivität war je nach dem genutzten Wachstumssubstrat verschieden. Weiterführend sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auch bei anderen Enzymen des Energiestoffwechsels beobachtet werden kann. Aus diesem Grund erfolgte zusätzlich die Bestimmung der Aktivitäten der Nitrat- und Fumarat-Reduktase im Rohextrakt von *S. multivorans* nach 5 und 20 Subkultivierungen unter Verwendung verschiedener Substrate (Abbildung 35).



**Abbildung 35. Enzymaktivitäten der Fumarat-Reduktase (A) und Nitrat-Reduktase (B) im Rohextrakt von *S. multivorans* kultiviert mit verschiedenen Substratkombinationen**

Dargestellt ist der Verlauf der spezifischen Aktivitäten der Fumarat-Reduktase (A) und Nitrat-Reduktase (B) nach 5 (☉) und 20 (☉) Subkultivierungen jeweils aus einer Langzeitkultivierung mit unterschiedlichen Substraten. **Pyr**: Pyruvat, **Fum**: Fumarat; Kulturen wurden jeweils mit 10 % aus der vorherigen angeimpft. Subkultur 0 entspricht Vorkultur auf Acetat/Formiat/PCE. Angegebene Enzymaktivitäten sind Mittelwerte aus 3 Messungen, Kultivierung wurde jeweils einmal durchgeführt.

Aus Abbildung 35A wird ersichtlich, dass die Fumarat-Reduktase auf den Substratkombinationen Pyruvat/ Nitrat, Pyruvat/Sauerstoff und Pyruvat/ PCE nach 20 Subkulturen annähernd die gleiche Aktivität besaß wie nach 5 Subkultivierungen. Die Fumarat-Reduktase-Aktivität in Pyruvat/Fumarat kultivierten Zellen war nach 20 Subkultivierungen geringer als nach 5 Subkultivierungen. Im Gegensatz dazu verdoppelte sich die Aktivität der Fumarat-Reduktase im gleichen Zeitraum der Langzeitkultivierung im Medium bei Verwendung des Substrates Fumarat.

Abbildung 35B gibt einen Überblick der Aktivitätsmessungen der Nitratreduktase in aufgeschlossenen Zellen von *S. multivorans* aus der Langzeitkultivierung mit unterschiedlichen Substraten. Wie die Fumarat-Reduktase-Aktivität wurde die Nitrat-Reduktase-Aktivität ebenfalls nach 5 und 20 Subkultivierungsschritten bestimmt. Eine Zunahme der Enzymaktivität um den Faktor 20 war im Nitrat-haltigem Medium von 5 zu 20 Subkultivierungsschritten zu verzeichnen. Mit der Substratkombination Pyruvat/Sauerstoff konnte eine Verdopplung der Aktivität der Nitrat-Reduktase nachgewiesen werden. Mit anderen Elektronendonoren und -akzeptorkombinationen war keine Änderung

(Pyruvat/Fumarat) bzw. nur eine geringe Reduzierung der Enzymaktivität gemessen worden (Pyruvat/PCE, Fumarat). Unabhängig von der verwendeten Substratkombination konnte sowohl eine aktive Fumarat- als auch Nitrat-Reduktase nach 20 Subkultivierungen (60 Generationen) bestimmt werden. Damit lies sich eine Regulation beider Enzyme innerhalb weniger Generationen ausschließen.

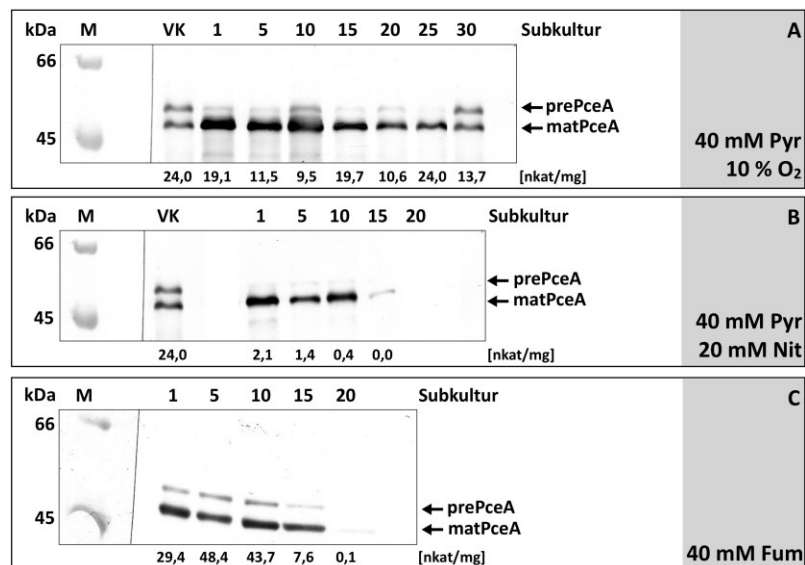
### **3.5.3. Expression der PCE-Dehalogenase**

Der Verlust der Aktivität der PCE-Dehalogenase geht mit der Abnahme der Biosynthese von PceA einher (John & Rubick *et al.* 2009). Aus diesem Grund wurde die Bildung der PCE-Dehalogenase in den Langzeitkultivierungen mit den verschiedenen Wachstumssubstraten überprüft. Dies erfolgte mit Antikörpern gegen PceA mittels Western-Blot-Analysen. In Abbildung 36 ist die Expression der PCE-Dehalogenase in der Langzeitkultivierung mit 40 mM Pyruvat/10 % Sauerstoff (A), 40 mM Pyruvat/20 mM Nitrat (B) und 40 mM Fumarat (C) dargestellt. Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Signale nach einer bestimmten Zeitdauer der Kultivierung schwächer wurden und schließlich nicht mehr nachweisbar waren. Mit der Kultivierung auf Pyruvat/10 % Sauerstoff war bis zum Subkultivierungsschritt 20 ein annähernd gleichstarkes Signal zu sehen. Dabei lag PceA hauptsächlich in seiner gereiften Form vor (matPceA, Abbildung 36A).

Bei der Kultivierung mit Pyruvat/Nitrat war im Western-Blot zum Subkultivierungsschritt 15 nur noch ein schwaches Signal zu sehen und ab Subkultur 20 war kein Signal mehr detektierbar (Abbildung 36B). Das stand im Einklang mit den Messungen der PCE-Dehalogenase-Aktivität (Abbildung 31, Tabelle 13). Bei diesen war in der Subkultur 15 nur noch eine geringe Aktivität messbar und ab Subkultur 20 war kein aktives Enzym mehr nachweisbar. Im Western-Blot wurde hauptsächlich matPceA detektiert. Allerdings lagen matPceA und prePceA (ungereiftes PceA mit TAT-Signal-Sequenz) in der Vorkultur zu ungefähr gleichen Anteilen vor.

Bei der Kultivierung mit Fumarat-haltigem Medium konnte PceA hauptsächlich in der gereiften Form nachgewiesen werden (Abbildung 36C). Allerdings war auch ein deutliches Signal von PceA mit Signal-Peptid (prePceA) sichtbar, das jedoch in Subkultur 15 nicht mehr detektierbar war. Fumarat im Medium schien einen Einfluss auf die Prozessierung der PCE-Dehalogenase auszuüben. Ab dem Zeitpunkt von 20 Subkultivierungen konnte in den Zellen

keine PCE-Dehalogenase mehr nachgewiesen werden, was ebenfalls im Einklang mit den Enzymaktivitätsmessungen stand (Abbildung 31, Tabelle 13).

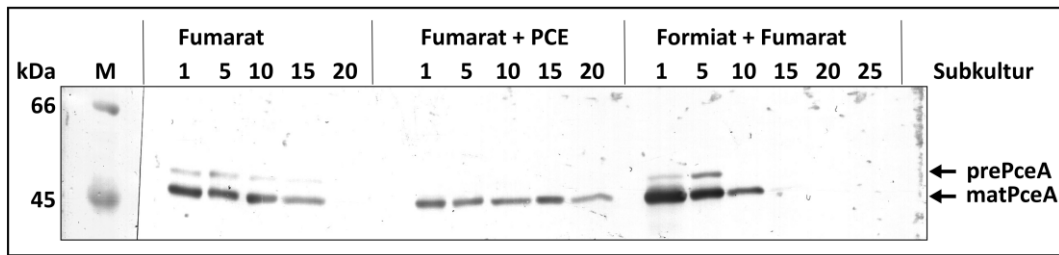


**Abbildung 36. Western-Blot-Analysen zur Expression der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* in der Langzeitkultivierung mit verschiedenen Substraten**

(A) Pyruvat + O<sub>2</sub>, (B) Pyruvat + Nitrat, (C) Fumarat; Nachweis mit spezifischen Antikörpern gegen PceA; pro Spur wurden 1 µg Gesamtprotein aufgetragen; **M**: Marker, **VK**: Vorkultur (Acetat Formiat PCE), **Subkultur**: Angabe des Subkultivierungsschrittes, **[nkat/mg]**: Angabe der spezifischen Aktivität der PCE-Dehalogenase am entsprechenden Subkultivierungsschritt, **matPceA**: gereifte PCE-Dehalogenase, **prePceA**: PCE-Dehalogenase mit TAT-Signal-Peptid

### 3.5.4. Einfluss von Fumarat auf Reifung von PceA

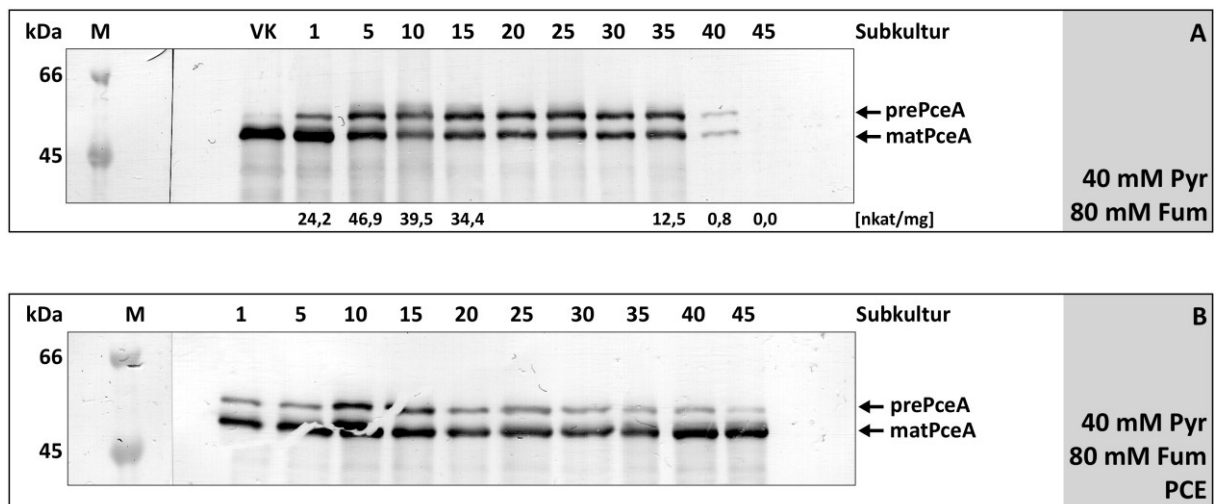
Zur Überprüfung, ob Fumarat als Substrat die Reifung der PCE-Dehalogenase beeinflusst und deshalb ein größerer Anteil von prePceA im Gesamtprotein von *S. multivorans* vorliegt, wurde eine Langzeitkultivierung mit unterschiedlichen Substratkombinationen, die jeweils Fumarat enthielten, durchgeführt. Die Expression der PCE-Dehalogenase wurde mittels Western-Blot-Analysen nachgewiesen (Abbildung 37). Dieser zeigte, dass bei den verwendeten Wachstumssubstraten 40 mM Fumarat, 40 mM Fumarat/10 mM PCE und 20 mM Formiat/20 mM Fumarat überwiegend gereiftes PceA vorkam. Zu den Zeitpunkten, an denen die Expression und Aktivität der PCE-Dehalogenase geringer wurde, nahm die Menge von prePceA ab. Bei Anwesenheit von PCE im Medium wurde ausschließlich die gereifte Form der PCE-Dehalogenase nachgewiesen wurde. Somit schien das Vorkommen von PCE eher Einfluss auf die Reifung von PceA auszuüben als Fumarat.



**Abbildung 37. Nachweis Expression der PCE-Dehalogenase mittels Western-Blot in Langzeitkultivierung mit den Substraten Fumarat, Fumarat + PCE und Formiat + Fumarat**

*S. multivorans* 40 mM Fumarat, 40 mM Fumarat + 10 mM PCE, 20 mM Formiat + 20 mM Fumarat + 5 mM Acetat; Nachweis mit spezifischen Antikörpern gegen PceA auf Western-Blot; pro Spur wurden 1 µg Gesamtprotein aufgetragen; **M**: Marker, **Subkultur**: Angabe des Subkultivierungsschrittes, **matPceA**: gereifte PCE-Dehalogenase, **prePceA**: PCE-Dehalogenase mit TAT-Signal-Peptid

Falls Fumarat die Reifung von PceA beeinflussen sollte, könnte ein Überschuss dieses Substrates gegenüber Pyruvat diesen Effekt verstärken und somit den Anteil an ungereiftem prePceA in den Zellen erhöhen. Die Langzeitkultivierung mit 40 mM Pyruvat + 80 mM Fumarat ± PCE und Analyse der Expression der PCE-Dehalogenase sind in Abbildung 38 dargestellt. In der Vorkultur lag erwartungsgemäß überwiegend gereiftes PceA vor, jedoch nahm der Anteil von prePceA gegenüber PceA nach Transfer auf 40 mM Pyruvat + 80 mM Fumarat zu (Abbildung 38A).



**Abbildung 38. Nachweis Expression der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans***

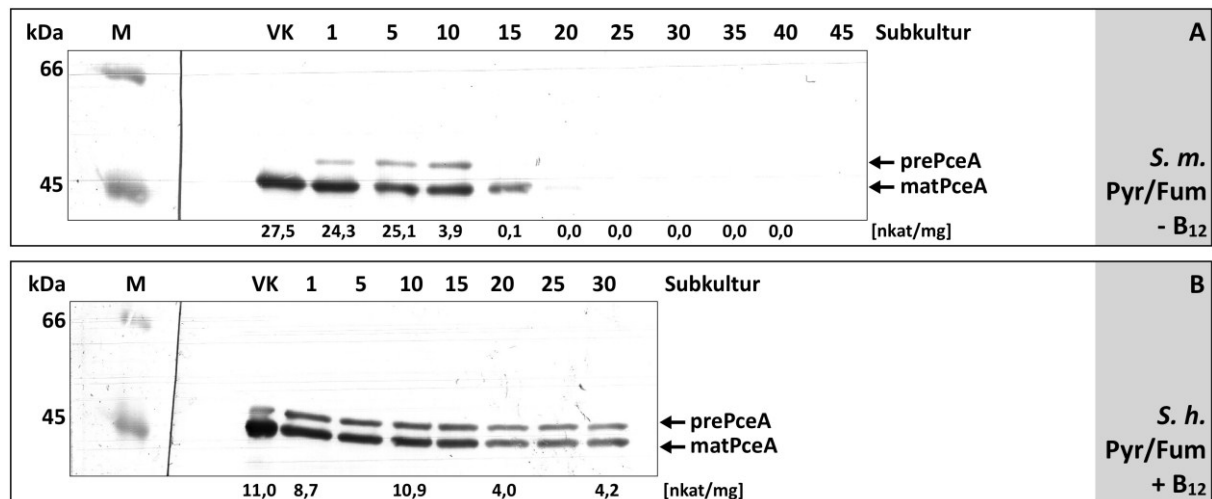
(A) 40 mM Pyruvat + 80 mM Fumarat, (B) 40 mM Pyruvat + 80 mM Fumarat + 10 mM PCE; Nachweis mit spezifischen Antikörpern gegen PceA auf Western-Blot; pro Spur wurden 1 µg Gesamtprotein aufgetragen; **M**: Marker (kDa), **VK**: Vorkultur (Acetat Formiat PCE), **Subkultur**: Angabe des Subkultivierungsschrittes, **[nkat/mg]**: Angabe der spezifischen Aktivität der PCE-Dehalogenase am entsprechenden Subkultivierungsschritt, **matPceA**: gereifte PCE-Dehalogenase, **prePceA**: PCE-Dehalogenase mit TAT-Signal-Peptid

Ab Subkultivierungsschritt 10 lagen prePceA und PceA zu gleichen Anteilen vor. In Subkultur 40 konnte nur noch ein schwaches Signal bzw. ab Subkultur 45 kein Signal mehr detektiert

werden. Zu diesen Zeitpunkten war nur noch eine geringe bzw. keine Enzymaktivität zu messen (Abbildung 33). Wurde dem Medium zusätzlich PCE zugesetzt, konnte bis zum Subkultivierungsschritt 45 keine Verringerung der Bildung von PceA beobachtet werden (Abbildung 38B). Dabei überwog der Anteil an matPceA gegenüber prePceA, wobei die Verhältnisse im Laufe der Kultivierung ungefähr gleich blieben.

Damit konnte gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von PCE im Kultivierungsmedium überwiegend matPceA in den Zellen vorlag. Das stand auch im Einklang mit bisher veröffentlichten Daten (John *et al.* 2006)

Die Messungen der Enzymaktivitäten der PCE-Dehalogenase der Kultivierung von *S. multivorans* mit Pyruvat und Fumarat ohne zugesetztes Vitamin B<sub>12</sub> zeigten, dass die Aktivität ab Subkultur 15 stark abnahm. Weiterhin konnte ab der 25. Subkultur keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden (Abbildung 32, Tabelle 13). Diese Abnahme könnte durch eine verringerte Expression des Enzymes ab der 15. Subkultur verursacht worden sein (Abbildung 39A). Zum Zeitpunkt von 20 Subkultivierungen war keine exprimierte PCE-Dehalogenase nachweisbar, was mit dem Verlust der Enzymaktivität einherging. Im Western-Blot konnte hauptsächlich die PCE-Dehalogenase in der gereiften Form detektiert werden.



**Abbildung 39. Expression der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* und *S. halorespirans***

(A) *S. multivorans* 40 mM Pyruvat + 40 mM Fumarat ohne B<sub>12</sub>, (B) *S. halorespirans* 20 mM Pyruvat + 20 mM Fumarat; Nachweis mit spezifischen Antikörpern gegen PceA auf Western-Blot; pro Spur wurden 1 µg Gesamtprotein aufgetragen; **M**: Marker, **VK**: Vorkultur (Acetat Formiat PCE), **Subkultur**: Angabe des Subkultivierungsschrittes, **[nkat/mg]**: Angabe der spezifischen Aktivität der PCE-Dehalogenase am entsprechenden Subkultivierungsschritt, **matPceA**: gereifte PCE-Dehalogenase, **prePceA**: PCE-Dehalogenase mit TAT-Signal-Peptid

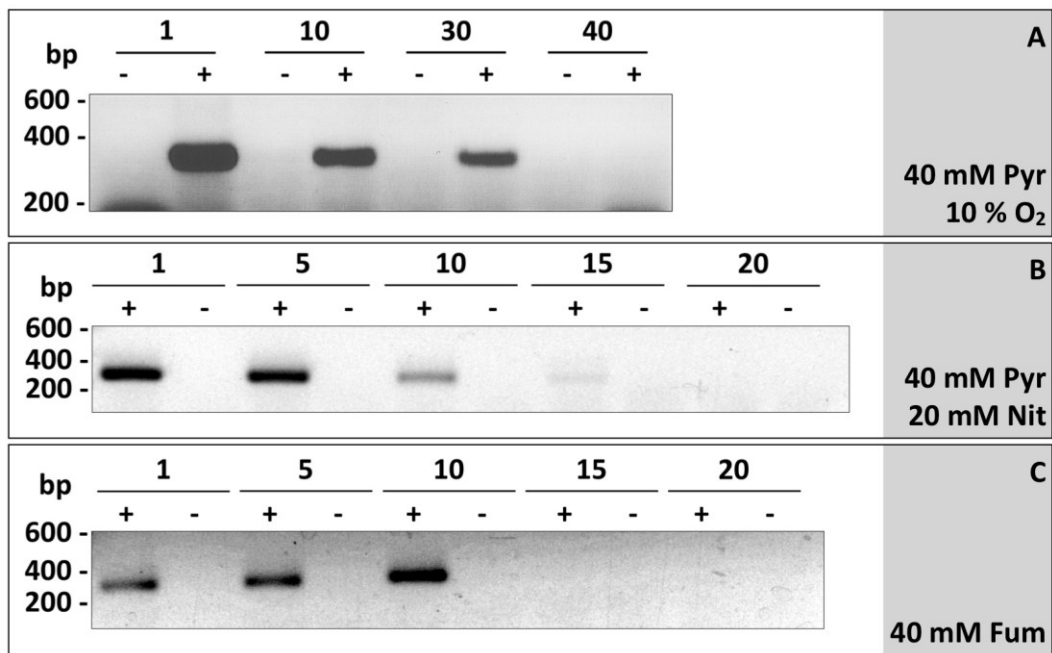
In der Langzeitkultivierung von *S. halorespirans* mit 40 mM Pyruvat und 20 mM Fumarat konnte eine Abnahme ab Subkultur 20, jedoch kein vollständiger Verlust der PCE-Dehalogenase-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 32). Die durch die Western-Blot-Analysen gewonnenen Ergebnisse zeigten eine Expression der PCE-Dehalogenase im Verlauf der gesamten Langzeitkultivierung bis zur Subkultur 30 (Abbildung 39). Ab der 20. Subkultur nahm die Intensität des Western-Blot-Signals ab und korrelierte damit mit den Enzymmessungen der PCE-Dehalogenase. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Anteil von gereifter und ungereifter Form der PCE-Dehalogenase gleich war. Damit lag offensichtlich auch in *S. halorespirans* ein großer Teil an gebildeten PceA in den Zellen als prePceA vor. Weiterführende Untersuchungen könnten einen möglichen Einfluss von PCE auf die Prozessierung von PceA darlegen.

### 3.5.4. Transkript von *pceA*

Aus vorangegangenen Untersuchungen war bereits bekannt, dass bei der Langzeitkultivierung mit Pyruvat und Fumarat der Verlust der Aktivität der PCE-Dehalogenase mit Abnahme der Expression des Gens einherging (John & Rubick *et al.* 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die Expression auch bei anderen Wachstumssubstraten eingestellt wird und damit die abnehmende Enzymaktivität verursacht. Als Nachweis einer Regulation der PCE-Dehalogenase auf Transkriptionsebene erfolgten RT-PCR-Analysen von *pceA* bei verschiedenen Wachstumssubstraten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Langzeitkultivierung.

Die stufenweise Abnahme der Expression von *pceA* bei Kultivierung auf Pyruvat/O<sub>2</sub>, Pyruvat/Nitrat und Fumarat ist in Abbildung 40 zu sehen. Die gebildete Menge des Transkriptes nahm bis zur Subkultur 30 ab und in Subkultur 40 konnte keine *pceA* mRNA detektiert werden. Zum Zeitpunkt der Subkultur 40, an dem keine Expression mehr statt fand, war noch eine geringe Enzymaktivität messbar.





**Abbildung 40. RT-PCR zur Detektion der Transkription von *pceA* in der Subkultivierung von *S. multivorans* mit unterschiedlichen Substraten**

Isolierte Gesamt-RNA: 1 µg an Subkultivierungsschritten **1, 5, 10, 15, 20, 30** und **40** aus der Langzeitkultivierung mit folgenden Substraten: **(A)** 40 mM Pyruvat/10 % O<sub>2</sub>; **(B)** 40 mM Pyruvat/20 mM Nitrat; **(C)** 40 mM Fumarat. Pro Spur wurden 10 µl aufgetragen (entspricht 200 ng isolierter Gesamt-RNA), Färbung des Agarose-Gels mit Ethidiumbromid; - ohne reverse Transkriptase, + mit reverse Transkriptase; **Pyr**: Pyruvat, **Nit**: Nitrat, **Fum**: Fumarat

### 3.6. Induktion der PCE-Dehalogenase

Die Induzierbarkeit der PCE-Dehalogenase in PceA<sup>-</sup>-Zellen wurde bereits in der Vergangenheit gezeigt. Weiterhin konnte mit PCR-Versuchen dargelegt werden, dass PceA<sup>-</sup>-Zellen weiterhin das *pceA*-Gen im Genom tragen (John 2007). Diese Ergebnisse erlaubten jedoch keinen Rückschluss darauf, ob der Verlust der Aktivität und Expression der PCE-Dehalogenase auf eine Mutation im Operon zurückzuführen ist. Es wäre denkbar, dass im Verlauf einer langen Subkultivierung in Abwesenheit von PCE kleinere Mutationen im nicht mehr benötigten Gen auftreten, die schließlich zu einer „Ausverdünnung“ von *pceA* führen. Dann würde keine Regulation der PCE-Dehalogenase vorliegen. Wenige noch vorkommende Zellen mit intaktem *pceA* würden beim Transfer auf PCE-haltiges Medium einen selektiven Vorteil besitzen. Das könnte dazu führen, dass nur diese Zellen in der Lage wären, in kurzer Zeit das neue Medium als Wachstumssubstrat zu nutzen. Die Vermehrung dieser Zellen würde dann zu einer relativen Zunahme an PceA führen, was eine Induktion „vortäuschen“ würde.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Zellen aus einer Langzeitkultivierung von mehr als 140 Subkultivierungen mit Pyruvat und Fumarat in anaerobe Rolltubes überführt. Dadurch konnten Einzelkolonien gewonnen werden. Eine Auswahl von Einzelkolonien wurde anschließend in PCE-haltiges Flüssigmedium überimpft und die Expression von PceA verfolgt. Zum Beginn der Kultivierung konnten weder Expression noch Aktivität von PceA nachgewiesen werden. Innerhalb von zwei bis vier Wochen konnte bei 95 % aller Einzelkolonien auf Medium mit Pyruvat/PCE eine Induktion der PCE-Dehalogenase beobachtet werden.

**Tabelle 15. Induktion der PCE Dehalogenase in PceA<sup>-</sup> Zellen**

Langzeitkulturen auf verschiedenen Substratkombinationen wurden auf PCE-haltiges Medium (Acetat/Formiat/PCE) überimpft und folgende Wachstumsparameter aufgenommen.

Substrat <sup>1</sup>	vor Induktion (nach Transfer)			nach Induktion		
	OD <sub>578</sub>	Proteingehalt [µg/ml]	cDCE [µM]	OD <sub>578</sub>	Proteingehalt [µg/ml]	cDCE [µM]
Pyr / Fum	0,105	21	< 25	0,298	120	4210
Pyr / O <sub>2</sub>	0,109	13	< 25	0,191	66	2865
Pyr / Nit	0,123	12	< 25	0,169	58	2632
Fum	0,112	11	< 25	0,198	55	2933
For / Fum	0,099	6	< 25	0,153	41	1293

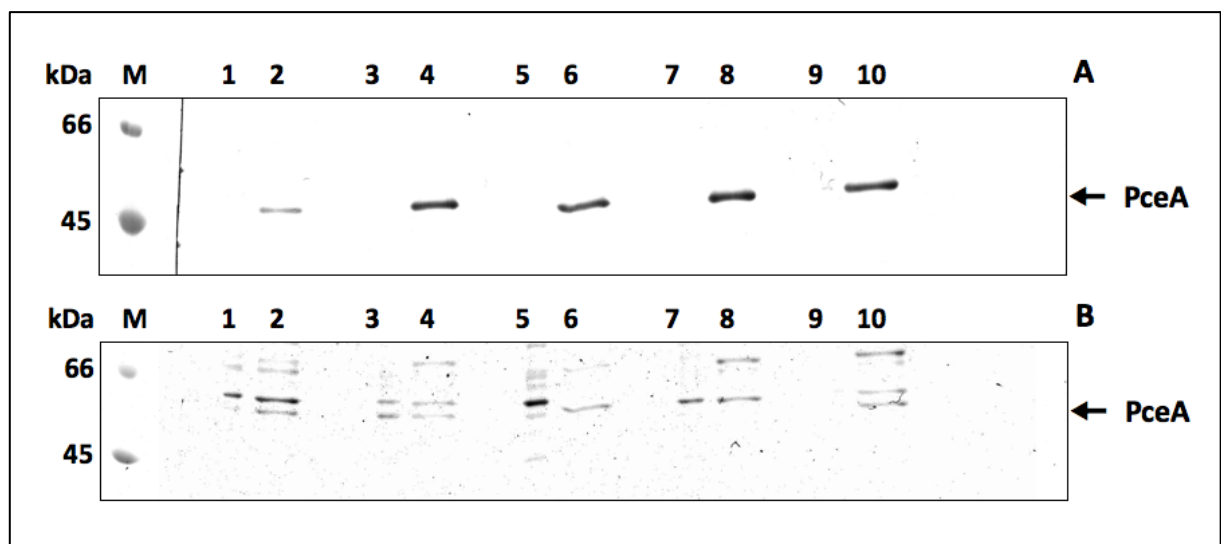
<sup>1</sup> Substratkonzentrationen Tabelle 1 (Abschnitt 2.2., Seite 15)

**Pyr:** Pyruvat, **Fum:** Fumarat, **Nit:** Nitrat, **For:** Formiat

PceA<sup>-</sup>-Kulturen von *S. multivorans*, die aus der Langzeitkultivierung auf 40 mM Pyruvat und 40 mM Fumarat hervorgingen, wurden in PCE-haltiges Medium überführt. Dieses Medium enthielt als zusätzliches Energiesubstrat 40 mM Formiat und als Kohlenstoffquelle 5 mM Acetat. Energiegewinn und Wachstum von *S. multivorans* waren durch Dehalorespiration möglich, was eine aktive PCE- und Formiatdehydrogenase voraussetzt. In Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die PCE-Dehalogenase zirka 50 Stunden nach Transfer auf Formiat/PCE-Medium unter gleichzeitiger Zunahme der optischen Dichte und Abbau von PCE zu cDCE induziert wurde (siehe auch John 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnten PceA<sup>-</sup>-Kulturen aus Langzeitkultivierungen mit verschiedenen Wachstumssubstraten gewonnen werden. Als Substratkombinationen dienten: 40 mM Pyruvat/40 mM Fumarat, 40 mM Pyruvat/10 % Sauerstoff, 40 mM Pyruvat/20 mM Nitrat, 40 mM Fumarat sowie 20 mM Formiat/20 mM Fumarat. Um die

Induzierbarkeit der PCE-Dehalogenase zu bestätigen, wurden diese Kulturen auf Medium, das 40 mM Formiat und 10 mM PCE (zusätzlich 5 mM Acetat als Kohlenstoffquelle) enthielt, überimpft. Es wurden folgende Wachstumsparameter aufgenommen: OD<sub>578</sub>, Proteingehalt und cDCE-Konzentration. Außerdem wurde die Expression der PCE-Dehalogenase mit Hilfe von Western-Blot-Analysen nachgewiesen (Abbildung 41). Wie Tabelle 15 zu entnehmen, konnte in jeder Kultur eine Zunahme der Zelldichte und des Proteingehalts beobachtet werden. Darüber hinaus konnte der Umsatz von PCE zu cDCE gezeigt werden. Die Induktion der PCE-Dehalogenase in PceA<sup>-</sup>-Zellen war somit unabhängig vom verwendeten Substrat der Langzeitkultivierung möglich. Das spricht für eine Expressionsregulation von *pceA* in *S. multivorans*.



**Abbildung 41. Nachweis der Induktion der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* mit Western-Blot**

(A) Western-Blot mit PceA-Antikörpern, (B) SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Kulturen aus Langzeitkultivierung mit: Pyruvat/Fumarat: (1) vor Induktion, (2) nach Induktion; Pyruvat/O<sub>2</sub>: (3) vor Induktion, (4) nach Induktion; Pyruvat/Nitrat: (5) vor Induktion, (6) nach Induktion; Fumarat: (7) vor Induktion, (8) nach Induktion; Formiat/Fumarat: (9) vor Induktion, (10) nach Induktion; pro Spur wurden 1 µg Gesamtprotein aufgetragen, M: Marker (kDa)

### 3.7. Proteomanalysen

#### 3.7.1. Lösliche Proteine bei Wachstum mit verschiedenen Substraten

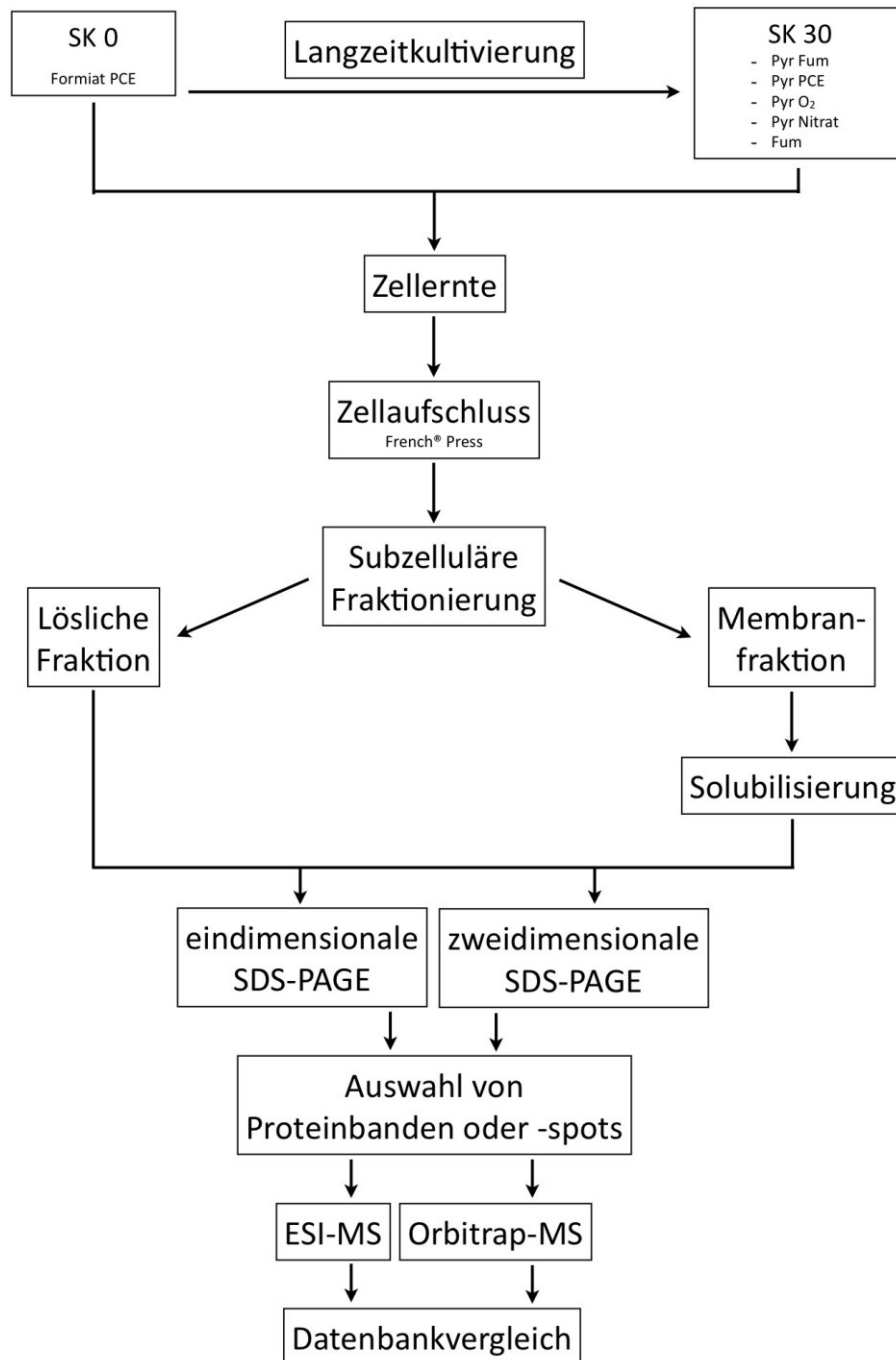
Die Analyse der Proteinzusammensetzung von *S. multivorans* in der Langzeitkultivierung mit unterschiedlichen Substraten könnte Unterschiede offen legen, die Rückschlüsse auf mögliche Regulationsmechanismen der Expression der PCE-Dehalogenase erlauben.

Die aus den verschiedenen Stadien von Langzeitkultivierungen mit unterschiedlichen Substraten gewonnenen Zellen wurden geerntet und einer subzellulären Fraktionierung

unterzogen. Eine schematische Übersicht zur Probenvorbereitung und durchgeführten Proteomanalysen ist in Abbildung 42 dargestellt.

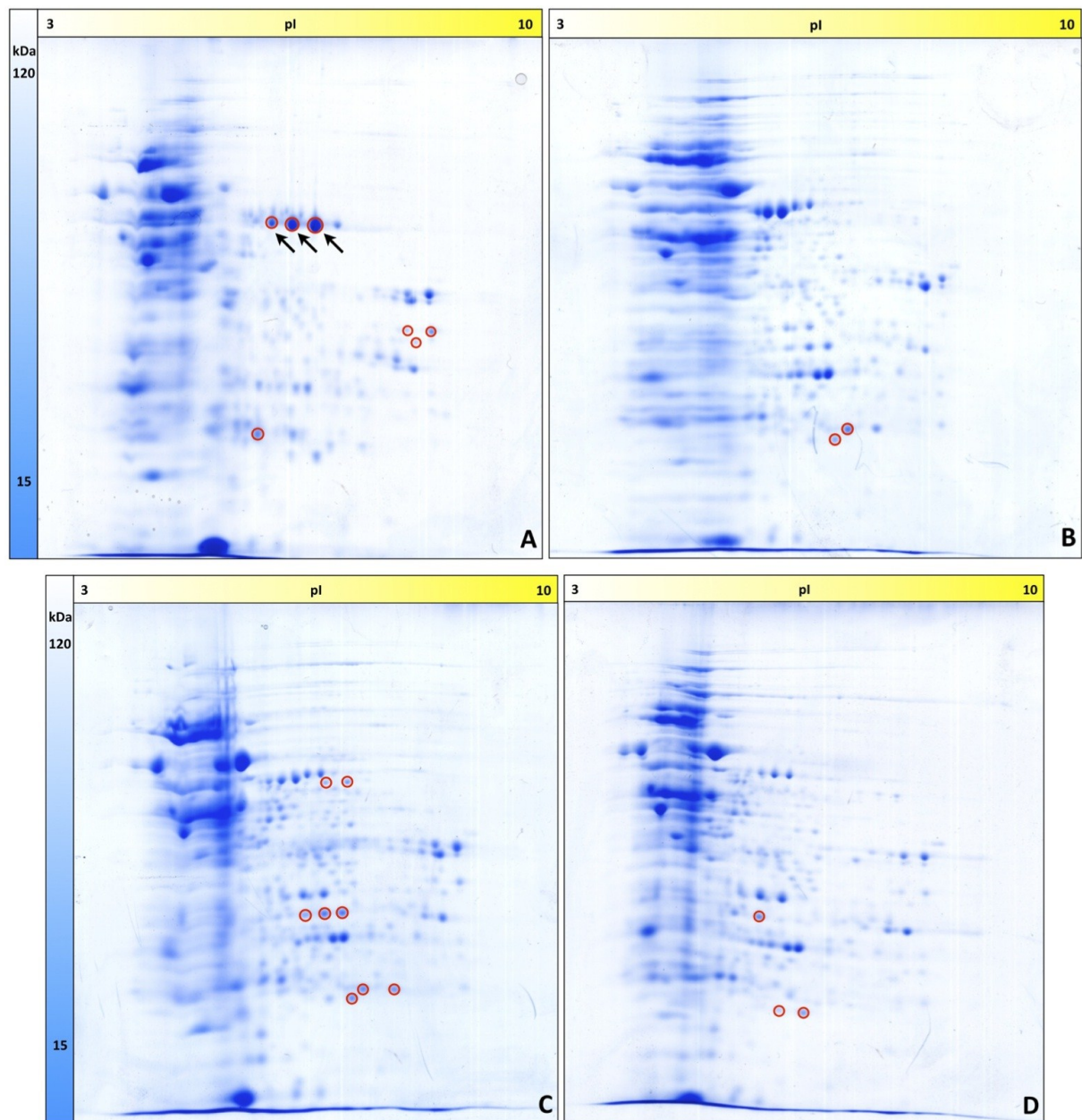
Zunächst wurden die löslichen Proteine aus Zellen unterschiedlicher Kultivierungen mittels eindimensionaler SDS-PAGE aufgetrennt. Aufgrund der komplexen Anzahl an vorhandenen Proteinen ließen sich jedoch mit dieser Methode keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungen feststellen (Daten nicht gezeigt). So konnte mit dieser Methode nicht zwischen PceA<sup>+</sup> und PceA<sup>-</sup> Proteinextrakten unterschieden werden. Da regulatorische Proteine eher in geringen Mengen in den Zellen vorkommen, war die eindimensionale SDS-PAGE nicht die Methode der Wahl.

Mit Hilfe einer zweidimensionalen SDS-PAGE konnte eine bessere Auftrennung der Proben erzielt werden (Abbildung 43). Des Weiteren wurde für ausgewählte Proteinspots Peptidsequenzanalyse mittels ESI-MS durchgeführt. Mittels dieser Methode konnte bei den Substraten Formiat/PCE und Pyruvat/PCE die PCE-Dehalogenase, verteilt auf drei Proteinspots, identifiziert werden (in Abbildung 43 mit Pfeilen markiert). Bei den anderen Substratkombinationen konnte keine PCE-Dehalogenase identifiziert werden, was allerdings auf Grund der vorangegangenen Enzymaktivitätsmessungen den Erwartungen entsprach. Eine Kontrolle der Expression von PceA mittels Western-Blot-Analyse bestätigte dies (Daten nicht gezeigt). Das Vorkommen von matPceA und prePceA (mit TAT-Signalpeptid) könnte zwei Spots der PCE-Dehalogenase erklären und der dritte könnte möglicherweise ein Abbauprodukt von PceA sein. Die genaue Ursache dafür blieb jedoch ungeklärt. Weiterhin wurden einige Spots, die sich in Intensität und Vorhandensein unterschieden, zwecks Peptidsequenzbestimmung weitergehend untersucht (in Abbildung 43 mit roten Kreisen markiert). Die Analyse der ausgewählten Proteinspots ergab jedoch keine Beteiligung von Proteinen, die eindeutig auf eine regulatorische Funktion schließen ließen. Es wurden sowohl Transportproteine und in Stoffwechselprozesse involvierte Proteine als auch in den Datenbanken nicht näher beschriebene Proteine identifiziert (Tabelle 16, Seite 86).



**Abbildung 42. Übersicht Probenaufarbeitung für Proteomanalysen**

Schematische Darstellung der Probenvorbereitung und Proteom-Analyse von Proteinextrakten aus *S. multivorans*. Ausgehend von Langzeitkultivierung erfolgten Zellernte und Zellaufschluss und anschließend subzelluläre Fraktionierung. Auftrennung der Zellfraktionen mit ein- oder zweidimensionaler SDS-PAGE. Nach Auswahl von Proteinbanden oder -spots erfolgte die Analyse mittels Massenspektrometrie und Auswertung durch Datenbankvergleiche. **MS**: Massenspektrometrie, **For**: Formiat, **Pyr**: Pyruvat, **Fum**: Fumarat, **SK**: Subkultur



**Abbildung 43. 2D-SDS-PAGE zur Auftrennung löslicher Proteine von *S. multivorans* aus der Langzeitkultivierung mit unterschiedlichen Substraten**

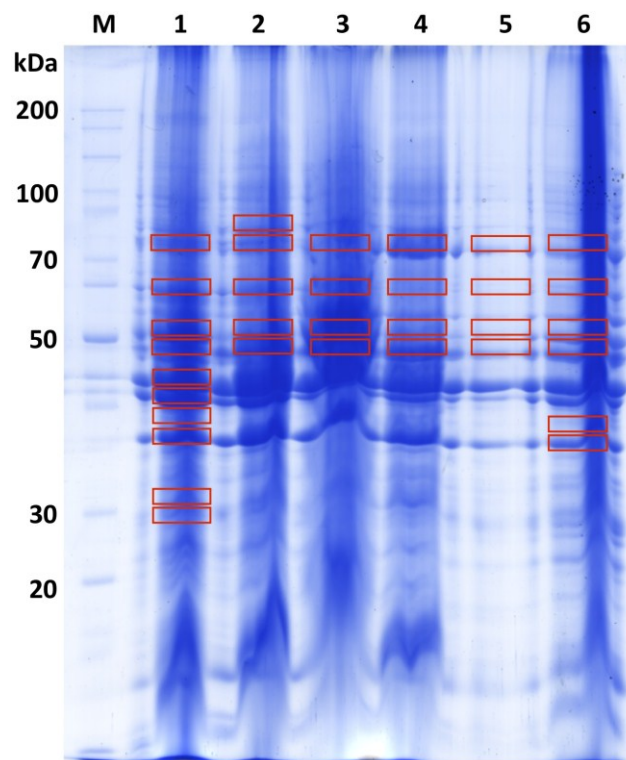
Substrate: (A) Formiat/PCE, (B) Pyruvat/Fumarat, (C) Pyruvat/O<sub>2</sub>, (D) Pyruvat/Nitrat; Auftrennung der Proteine 1. Dimension: pl 3-10, 2. Dimension: 10-120 kDa; **rot umkreiste Spots**: wurden zur weiteren Analyse ausgeschnitten, **Pfeile**: Protein-Spots für PceA

### 3.7.2. Identifizierung respiratorischer Enzyme der Membranfraktion

Darüber hinaus sollte in folgenden Untersuchungen in respiratorische Prozesse eingebundener Proteine in langzeitkultivierten Zellen von *S. multivorans* mit unterschiedlichen Wachstumssubstraten identifiziert werden. Da der respiratorische Stoffwechsel membrangebunden oder -assoziiert stattfindet, erfolgten die weiteren Untersuchungen hauptsächlich mit Membranfraktionen. Die Membranproteine aus

*S. multivorans* wurden mittels ein- oder zweidimensionaler SDS-PAGE getrennt und einer Peptidsequenzierung mittels ESI-MS oder Orbi-Trap unterzogen.

Zunächst erfolgte eine Trennung der Membranproteine mittels eindimensionaler SDS-PAGE und anschließender Bestimmung der N-terminalen Peptidsequenz einiger Proteine (siehe Markierungen in Abbildung 44).



**Abbildung 44. SDS-PAGE (10,4 % AA/Bis) Membranfraktionen von *S. multivorans* aus verschiedenen Kultivierungen**

Spuren: (1) Acetat/Formiat/PCE, (2) Pyruvat/PCE, (3) Pyruvat/Fumarat, (4) Pyruvat/Nitrat, (5) Fumarat, (6) Pyruvat/O<sub>2</sub>, **M**: Marker (kDa); markierte Bereiche wurden zur Bestimmung der Peptidsequenz mit ESI-MS ausgeschnitten; verwendeter Größenstandard: PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot

Wie aus Abbildung 44 ersichtlich, wurde aufgrund der schlechten Löslichkeit der überwiegend hydrophoben Membranproteine nur unzureichend aufgetrennt. Deshalb waren nur wenige definierte Proteinbanden sichtbar. Das erschwerte die Bestimmung der N-terminalen Peptidsequenz. Es konnten neben Chaperonin GroL, Translation Elongations Factor 2, ATPsynthase F1 Untereinheiten, Tetrachlorethen reduktive Dehalogenase (Formiat/PCE, Pyruvat/PCE, Pyruvat/O<sub>2</sub>), Formiat Dehydrogenase Untereinheiten (Formiat/PCE) noch einige weitere Proteine identifiziert werden.

**Tabelle 16. Identifizierte Proteine im Zusammenhang mit Energiestoffwechsel aus Zellfraktionen (Löslich/Membranen), die aus langzeitkultivierten Kulturen von *S. multivorans* gewonnen wurden**

<b>Protein</b>
Formiat-Dehydrogenase
FdhA, Formiat Dehydrogenase, Untereinheit A
FdhB, Formiat Dehydrogenase, Untereinheit B
FdhC, Formiat Dehydrogenase, Untereinheit C
Membran-gebundene [NiFe]-Hydrogenase
HydA, Ni/Fe-Hydrogenase, kleine Untereinheit
HydB, Ni/Fe-Hydrogenase I, große Untereinheit
HydC, Ni/Fe-Hydrogenase, Cytochrom <i>b</i> -Untereinheit
Dehydrogenase, Selenocystein-haltig, anaerob
PCE Dehalogenase
PceA, Tetrachlorethen reduktive Dehalogenase, katalytisch aktive Untereinheit
PceB, Tetrachlorethen reduktive Dehalogenase, membrangebundene Untereinheit
Fumarat Reduktase
FrdA, Fumarat Reduktase, Flavoprotein Untereinheit
Succinat Dehydrogenase
SdhA, Succinat Dehydrogenase, Untereinheit A
SdhB, Succinat Dehydrogenase/Fumarat Reduktase Fe-S-Protein
Periplasmatische Nitrat-Reduktase
NapA, periplasmatische Nitrat-Reduktase, katalytische Untereinheit
Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase
Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, Homodimer, Flavodoxin
ATPase
$\alpha$ , ATP Synthase F1, alpha Untereinheit
$\beta$ , ATP Synthase F1, Subkomplex beta Untereinheit
$\gamma$ , ATP Synthase F1, Subkomplex gamma Untereinheit
Cytochrom <i>c</i> -Oxidase
Cytochrom <i>c</i> -Oxidase, <i>cbb3</i> -Typ, Untereinheit II
<i>cb</i> -Typ Cytochrom <i>c</i> -Oxidase Untereinheit III
Ubichinon-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase, Fe-S-Untereinheit
NADH Dehydrogenase
NADH Dehydrogenase Untereinheit B
NADH Dehydrogenase Untereinheit G
Twin Arginin Translocation (TAT)
TatB, twin arginine-targeting Protein Translokase
General Secretion Pathway (Sec)
SecA, Protein Translokase Untereinheit
SecE, Preprotein Translokase Untereinheit
Transporter
Schwermetall-translocating P-type ATPase, Cd/Co/Hg/Pb/Zn-Transport
FeoB, Fe-Transporter
CorA, Magnesium $Mg^{2+}$ und Cobalt $Co^{2+}$ Transportprotein
Corrinoid Biosynthese
Precorrin-8X Methylmutase
Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies
Superoxid-Dismutase
Elektronenübertragung
Chinon Dehydrogenase Membrankomponente



Allerdings gaben diese identifizierten Proteine keinen Hinweis auf eine Funktion in der Transkriptions- oder Translationsregulation der PCE-Dehalogenase. Weiterhin wurden keine Proteine identifiziert, die in die Biosynthese der PCE-Dehalogenase involviert sind.

Um eine bessere Trennung der Proteine in der SDS-PAGE zu erzielen, wurden die isolierten Membranen durch Behandlung mit unterschiedlichen Detergenzien solubilisiert. Dafür kamen Triton® X-114 und Digitonin zum Einsatz. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden Bereiche, die Proteine kleiner 35 kDa enthielten, ausgeschnitten und einer ESI-MS-Analyse unterzogen. Die erhaltenen Peptidsequenzen wurden bekannten Proteinen zugeordnet. Alle erhaltenen respiratorischen Enzyme und alle in Atmungsprozessen involvierten Proteine sind der Tabelle 16 zu entnehmen. Weiterhin wurde durch Verwendung höherprozentiger AA/Bis-Konzentrationen (bis 16 %) versucht, eine Trennung der Proteine im Größenbereich unter 10 kDa zu erreichen (nicht gezeigt). Allerdings konnten dabei nur Proteine mit einem Molekulargewicht größer 20 kDa getrennt werden. Insgesamt problematisch erwies dabei, dass gleiche Proteine in unterschiedlichen Größenbereichen vorzufinden waren. Das wies auf eine schlechte Trennung im Gel hin. Ursache dafür könnten eine unzureichende Denaturierung, zu hoch aufgetragene Proteinmengen oder störende Komponenten in den Proben sein.

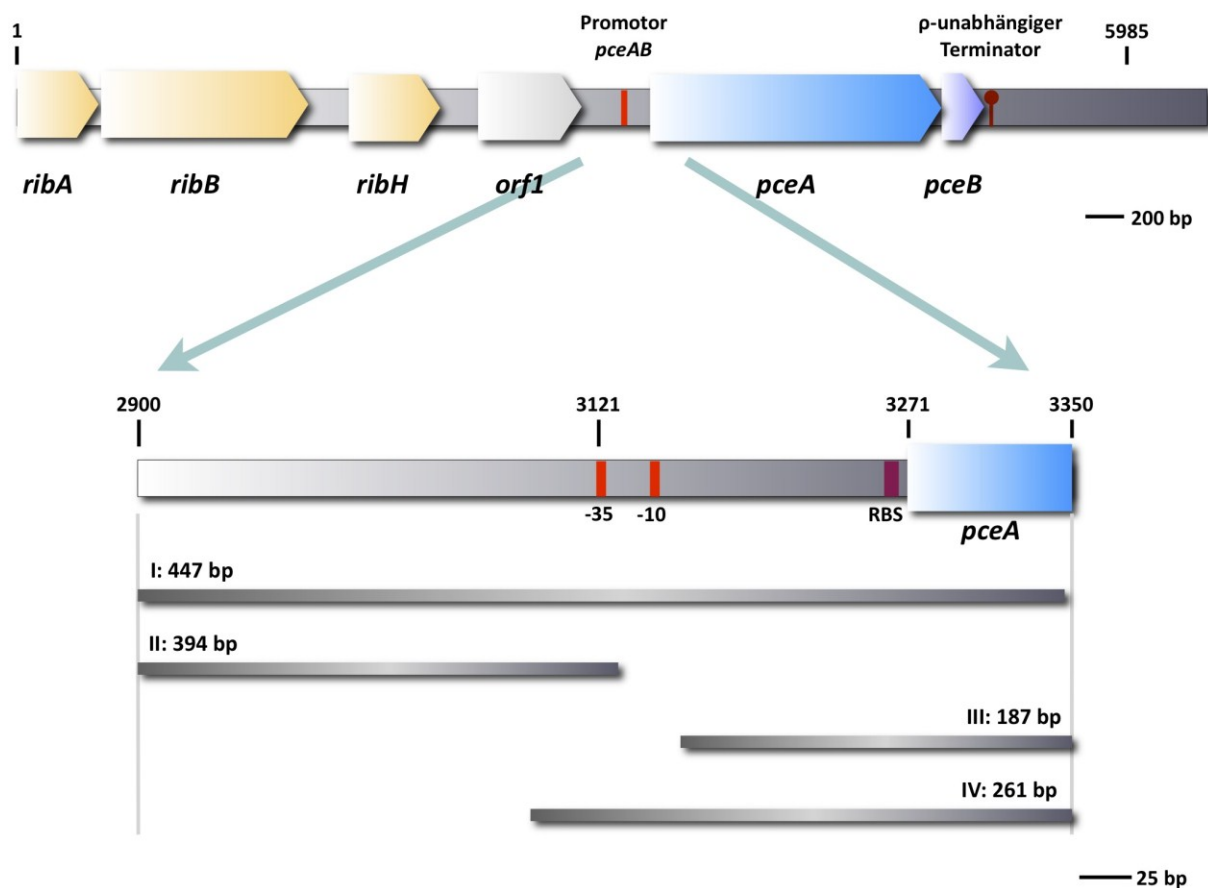
Es wurden in Formiat/PCE- und Formiat/Fumarat-kultivierten Zellen folgende Enzyme gefunden: PCE-Dehalogenase, Formiat-Dehydrogenase, Hydrogenase, Fumarat-Reduktase, Succinat-Dehydrogenase sowie Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase. Diese stehen im Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel der eingesetzten Substrate. Weiterhin konnten einige Komponenten der Atmungskette (NADH-Dehydrogenase, Cytochrom-Oxidase und ATPase) außerdem an Transportprozessen beteiligte Proteine (z. B. Tat, Sec) identifiziert werden (Tabelle 16). Eine Nitrat-Reduktase konnte in Zellen, die mit Formiat/PCE und Formiat/Fumarat kultiviert wurden, nach einem Datenbankabgleich nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich gelang der Nachweis, dass PceB in PceA<sup>+</sup>-Zellen vorlag.

### **3.7.3. Interaktion von Proteinen in der Promotorregion von *PceA***

Proteine, die an die DNA von *S. multivorans* im Bereich vor dem Operon von *PceA* und *PceB* binden, könnten eine regulatorische Funktion bei Expression besitzen. Aus diesem Grund wurde ein System verwendet, in dem DNA-Fragmente verschiedener Länge mit Rohextrakten inkubiert werden, die aus PceA<sup>+</sup> oder PceA<sup>-</sup> Zellen von *S. multivorans*

stammten. Nach mehreren Waschschritten und abschließender Elution erfolgte eine Trennung der Proteinlösung mittels SDS-PAGE.

Zunächst wurde festgestellt, dass eine hohe Anzahl verschiedener Proteine in dem Eluat vorhanden waren. Eine Intensivierung des Waschprozesses, um unspezifisch gebundene Proteine von den DNA-Fragmenten lösen zu können, führte allerdings zu keiner Verringerung der Proteinanzahl. In einem weiteren Versuch wurden kürzere DNA-Fragmente eingesetzt, um die Zahl der interagierenden Proteine zu reduzieren. Deshalb kamen verschiedene Fragmente unterschiedlicher Länge zum Einsatz, die verschiedene DNA-Bereiche im Promotor- bzw. Upstream-Bereich von *pceA* umfassen (Abbildung 45).



**Abbildung 45. Position und Größe der für Interaktionsstudien verwendeten DNA-Fragmente im Promotorbereich von *pceA***

Dargestellt werden Position und Größe der verwendeten DNA-Fragmente zur Untersuchung von spezifischen Protein-DNA-Interaktionen im Promotorbereich von *pceA/pceB* in *S. multivorans*. Vergrößerter Ausschnitt des DNA-Abschnittes zwischen *orf1* und *pceA* ist unten zu sehen. Im oberen Bereich der Abbildung ist 6 kb großes *EcoRI*-Fragment aus der genomischen DNA von *S. multivorans* dargestellt (Neumann *et al.* 1998; Genbank Nummer: AF022812), **-35 -10**: möglicher Promotorbereich von *pceA/pceB*, **RBS**: mutmaßliche Ribosomen-Binde-Stelle; graue Balken: Größe und Abdeckungsbereich der verwendeten DNA-Fragmente, **I-IV**: DNA-Fragment mit Größenangabe; Bezeichnung der Gene: *ribA*: GTP Cyclohydrolase II (unvollständig), *ribB*: 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat Synthase, *ribH*:  $\beta$ -Untereinheit der Riboflavin Synthase, *orf1*: unbekannt, *pceA*: PCE-Dehalogenase, *pceB*: mutmaßlicher Membrananker von PceA

Auch diese Modifikation führte nicht zur Reduzierung auf eine überschaubare Anzahl an Proteinen im Eluat. Kontrollversuche zeigten, dass der Proteinextrakt mit der DNA-bindenden Matrix selbst interagierte und anschließend eluierte. Darüber hinaus wurde das Vorhandensein der DNA-Fragmente nach Inkubation mit dem Proteinextrakt überprüft.

Aufgrund dieser Erkenntnisse, wurde vorerst auf weiterführende Experimente verzichtet, da eine tiefgreifende Optimierung der Methode zur Erhöhung der Interaktionsspezifität notwendig ist.

## 4. Diskussion

### 4.1. Einfluss des Redoxpotentials auf die reduktive Dechlorierung

Zahlreiche halogenierte Verbindungen anthropogenen und natürlichen Ursprungs kontaminieren weltweit Boden-Aquifer-Systeme und gelangen über das Trinkwasser in die Nahrungskette. Eine chemische Umwandlung und vollständige Mineralisierung in unbedenkliche Verbindungen geschieht zum großen Teil durch Gemeinschaften verschiedener Mikroorganismen (Vogel *et al.* 1987, Fetzner 1998, Dolfig 2000, Smidt & de Vos 2004). Ein entscheidender Prozess stellt dabei die reduktive Dechlorierung dar, die nur unter stark reduzierten, anaeroben, methanogenen Umweltbedingungen stattfindet (Gibson & Suflita 1986, Genthner *et al.* 1989, Mohn & Tiedje 1992, Townsend & Suflita 1997, Stuart *et al.* 1999). Diese Standorte, an denen Methanogenese stattfindet, sind durch Redoxpotentiale von weniger als -200 mV gekennzeichnet (Stuart *et al.* 1999, Suflita & Miller 1985). Die reduktive Dechlorierung von halogenierten Aliphaten wie Tetrachlorethen (PCE), Trichlorethen (TCE), Dichlorethen (DCE) sowie Vinylchlorid (VC) erfordert mit abnehmender Zahl an Chlorsubstituenten ein weniger stark reduzierendes Milieu (Bradley 2000). So kann die Reduktion von VC zu Ethen unter Fe(III)-reduzierenden Bedingungen stattfinden, während die Reduktion von PCE zu TCE nur unter strikt anaeroben, methanogenen Bedingungen möglich ist (Bradley 2000). Trotz einer weitverbreiteten mikrobiellen reduktiven Dehalogenierung von Grundwasserkontaminationen findet der Abbau in der Regel nur unvollständig bis zum DCE oder VC statt (DiStefano *et al.* 1991, de Bruin *et al.* 1992, Maymó-Gatell *et al.* 1995, Bradley 2000). Eine Ursache dafür sieht Bradley (2000) in nicht ausreichend stark reduzierenden Bedingungen. Die vorliegende Arbeit ging der Frage nach, ob das Redoxpotential einen Einfluss auf die Dechlorierung von PCE und TCE, insbesondere auf die Organohalid-Respiration, ausübt.

Die verwendeten Reinkulturen von *Sulfurospirillum multivorans* wuchsen in definiertem Kultivierungsmedium, in welchem Redoxpotentiale zwischen -250 mV und -50 mV gemessen wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich das Redoxpotential im Laufe der Kultivierung reduzierte und mit dem Erreichen der stationären Wachstumsphase einen stabilen Wert einnahm. Dieser variierte mit dem verwendeten Wachstumssubstrat. Stuart *et al.* (1999) berichten von einer methanogenen Mischkultur in definiertem Wachstumsmedium, in welchem sich wiederholt ein stabiles Redoxpotential von -260 mV ( $E_{SHE}$ ) einstellte. In einer Sulfat-reduzierenden Mischkultur konnte in einem Bioreaktor ein

stabiles Redoxpotential von rund -500 mV (gemessenes E) über einen Zeitraum von mehreren Monaten gemessen werden (Nevatalo *et al.* 2010). Allerdings wurden bisher Untersuchungen zum Redoxpotential in wachsenden Kulturen nur mit Mischkulturen durchgeführt. Somit können keine vergleichenden Betrachtungen über Reinkulturen und die Verwendung unterschiedlicher Wachstumssubstrate vorgenommen werden. In Boden-Grundwasser-Systemen werden Änderungen des Redoxpotentials durch natürlich vorkommende Mikroorganismen verursacht, die verschiedenste Reduktions- und Oxidations-Reaktionen katalysieren (Barcelona & Holm 1991). Diese Elektronen-Transfer-Reaktionen sind charakterisiert durch die verfügbaren und thermodynamisch nutzbaren Elektronenakzeptoren, wie Sauerstoff, Nitrat und Eisen (Jackson & Patterson 1982, Baedeker & Back 1979, Van Beek & Van Puffelen 1987). Als Resultat dieser mikrobiellen Redoxprozesse kommt es zur Ausbildung eines Redoxgradienten innerhalb einer Grundwasserkontamination durch halogenierte Kohlenwasserstoffe (Townsend & Suflita 1997, Lovley 2001, Winderl *et al.* 2008, Youngster *et al.* 2010). Somit unterliegt das Redoxpotential einer räumlichen und zeitlichen Variabilität (Barcelona *et al.* 1989). Daher könnte auch die Stoffwechselaktivität beim Wachstum von *S. multivorans* Änderungen des Redoxpotentials im Kultivierungsmedium verursachen. Die Reduktion von Restmengen an vorhandenem Sauerstoff trägt wahrscheinlich zum Teil zu den Änderungen der Redox-Bedingungen bei (Jacob 1970). Das Redoxpotential des Lebensraumes, indem die Bakterien vorkommen, wird offensichtlich durch ihre Stoffwechselaktivitäten verändert. Da Elektronentransportketten und respiratorische Enzyme größtenteils Membran-assoziiert oder -integral lokalisiert sind (Haddock & Jones 1977), besteht die Möglichkeit, dass die Redox-Bedingungen außerhalb der Zellen einen Einfluss auf Wachstum und Organohalid-Respiration ausüben können. Auch die PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* ist periplasmatisch lokalisiert (John *et al.* 2006) und für die Reduktion des Cobalamin-Cofaktors ist ein Redoxpotential von  $\leq -380$  mV (pH 7,0) notwendig (Siebert 2002).

Durch den Zusatz von redoxaktiven Substanzen zum Wachstumsmedium konnte keine signifikante Inhibition des Wachstums und der Dechlorierung von PCE bei *S. multivorans* festgestellt werden. Stuart *et al.* (1999) erhöhten das Redoxpotential im Medium einer methanogenen, dechlorierenden Mischkultur durch Zugabe der Oxidantien  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zwischen 60 und 260 mV. Die Autoren stellten dabei fest, dass Pentachlorphenol mit einer verringerten Rate dechloriert wurde. Nach Beenden des Zusatzes der Oxidantien

reduzierte sich das Redoxpotential auf den ursprünglichen Wert (-260 mV) und führte zu einem Anstieg der Dechlorierungsrate. Diese Beobachtungen zeigen, dass Stoffwechselprozesse in aneroben Organismen durch ein positives Redoxpotential beeinflusst werden können. In diesem Zusammenhang stellten Fetzer & Conrad (1993) fest, dass die Methanogenese in *Methanosarcina barkeri* ab einem Redoxpotential von  $> +50$  mV reversibel inhibiert wurde. Im Vergleich dazu konnte in Zellsuspensionen von *S. multivorans* keine Inhibition der Dechlorierung von PCE in Medium, welches mit  $K_3Fe(CN)_6$  auf +400 mV oxidiert wurde, beobachtet werden. Dabei fand die Dechlorierung von PCE unmittelbar nach dem Animpfen auch in Gegenwart eines  $E_{SHE} \geq +350$  mV statt. Damit schien der Umsatz von PCE und TCE in Anwesenheit von Kaliumhexacyanoferrat und bei deutlich positiven Redoxpotentialen nicht inhibiert zu sein. In einer Kontamination des Aquifer deutet eine biogeochemische Graduierung mit Redoxpotentialen zwischen +200 und +400 mV auf Nitrat-reduzierende Bedingungen hin (Vogel *et al.* 1987). Es kann demnach festgestellt werden, dass die Organohalid-Respiration auch unter diesen Bedingungen möglich ist. Die Notwendigkeit, durch kontinuierliche Titration mit Kaliumhexacyanoferrat ein konstant positives Redoxpotential von +400 mV aufrecht zuhalten, verdeutlicht die Reduktionsstärke von *S. multivorans*. Zum einen verbrauchte der Organismus unter anaeroben Bedingungen Pyruvat und Fumarat (jeweils 40 mM) innerhalb von 18 h bei einem konstantem  $E_{SHE}$  von +400 mV vollständig. Zum anderen erreichte die wachsende Kultur einen vergleichbaren Proteingehalt wie in einer Kontrollkultur. Auch in diesem Fall scheint der anaerobe Stoffwechsel nicht von einem positiven Redoxpotential beeinflusst zu werden. Das dem Medium hinzugefügte Kaliumhexacyanoferrat könnte durch *S. multivorans* von  $K_3[Fe(CN)_6]$  zu  $K_4[Fe(CN)_6]$  reduziert werden. Diese Reaktion könnte durch Cytochrome katalysiert werden (Fetzer & Conrad 1993), da auch in *S. multivorans* verschiedene Cytochrome nachgewiesen wurden (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995). Im Vergleich zu ruhenden Zellen konnten beim PCE-Abbau unter Zusatz redoxaktiver Verbindungen in wachsenden Kulturen minimale Unterschiede festgestellt werden.

Eine Möglichkeit, das Redoxpotential von Lösungen zu verändern, bietet der Einsatz von Elektroden, die von einem Potentiostaten gesteuert werden. Dieses System kann ohne zusätzliche Chemikalien betrieben werden oder unter Zusatz von redoxaktiven Verbindungen als Mediatoren in geringen Konzentrationen. Mithilfe eines solchen Systems wurde das Redoxpotential zwischen -600 und +400 mV variiert. Ein signifikanter Unterschied

im Wachstum mittels Organohalid-Respiration von *S. multivorans* konnten nicht festgestellt werden. Das steht im Einklang zu den Untersuchungen, bei denen das Redoxpotential durch chemische Verbindungen verändert wurde. Allerdings müssen die Ergebnisse der Potentiostat-regulierten Versuche mit Vorsicht interpretiert werden. Kontrollversuche zeigten, dass das Erreichen eines eingestellten Sollpotentials nur über einen langen Zeitraum möglich war. Das liegt offenbar in den physikalisch-chemischen Grenzen eines Elektroden-Potentiostat-Systems. So begrenzt die chemische Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, welche maximalen oder minimalen Redoxpotentiale erreicht werden können. Des Weiteren ist für eine zuverlässige Funktionsweise eine im Vergleich zum Lösungsvolumen sehr große Elektrodenoberfläche notwendig. Ebenfalls ist die Verwendung von Platin gegenüber Graphit von Vorteil (persönliche Mitteilung: Dr. Rudolph, Lehrstuhl für Anorganische Chemie II, Universität Jena). Zur Untersuchung von biologischen Systemen werden sowohl Graphit- als auch Platinelektroden verwendet. Dabei erfolgte der Einsatz solcher Elektrodensysteme unter den verschiedensten Gesichtspunkten (Emde & Schink 1990, Schuppert *et al.* 1992, Kaden *et al.* 2002, Gregory *et al.* 2004, Shimomura & Sanford 2005, Bond & Lovley 2005, Stams *et al.* 2006, Sakai & Yagishita 2007, Aulenta *et al.* 2007, Aulenta *et al.* 2009). Aulenta *et al.* (2007, 2009) nutzten ein Elektrodensystem, um die Dechlorierung von TCE in einer *Dehalococcoides* spp. enthaltenden Mischkultur zu stimulieren. Dabei wurde Methylviologen als Mediator durch die Elektrode bei Redoxpotentialen von  $< -450$  mV reduziert und diente dann als Elektronendonator für die Dehalogenierung. Deshalb kann man in dem von Aulenta *et al.* (2007) verwendeten System von einem positiven Effekt eines niedrigen Redoxpotentials auf die Dehalogenierung von chlorierten Ethenen sprechen. Allerdings beschränkt sich der Einfluss auf die Reduktion einer Mediatorverbindung, die als artifizieller Elektronendonator dient. Die Frage, inwieweit das Redoxpotential des Mediums durch die Elektrode verändert wurde, konnte ebenso wenig beantwortet werden, wie der Nachweis der Beteiligung der Mikroorganismen an der Dehalogenierung.

In den mit *S. multivorans* durchgeführten Versuchen war weder ein stimulierender noch ein inhibierender Einfluss des Redoxpotentials in Mediator-freien oder -haltigen Systemen auf die Organohalid-Respiration zu beobachten. Es ist jedoch denkbar, dass nicht alle Mediatoren den gleichen Einfluss auf eine Elektronentransportkette ausüben können (Aulenta *et al.* 2007). Allerdings wird von verschiedenen Autoren ein direkter Einfluss von

Elektroden auf Mikroorganismen beschrieben (Aulenta *et al.* 2007). Möglicherweise könnte eine Beeinflussung der Organohalid-Respiration von *S. multivorans* durch das Redoxpotential der Elektrode stattfinden. Jedoch war ein solcher Einfluss nicht nachweisbar und bekräftigt damit die Ergebnisse der Versuche mit den durch redoxaktive Verbindungen veränderten Redoxpotentialen.

Wenn Mikroorganismen reduzierenden oder oxidierenden Umweltbedingungen ausgesetzt sind, könnte dies zu einer Oxidation bzw. Reduktion von Elektronenüberträgern (Cytochrome,  $\text{NAD}^+$ , Chinone) und Redoxenzymen führen (Aulenta *et al.* 2007). Es wäre also möglich, dass die Reduktion des Cobalamin-Cofaktors der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* bei Redoxpotentialen  $> 0$  mV erschwert wird.

Eine Änderung der internen Redoxverhältnisse in *S. multivorans* verdeutlicht sich in den unterschiedlichen Verhältnissen an  $\text{NAD}^+$  zu NADH. Die Autoren um de Graef (1999) beschrieben bereits für *E. coli*, dass die zelluläre Konzentration an  $\text{NAD}^+$  und NADH den zellinternen Redoxstatus darstellen und damit auch den externen Redoxstatus widerspiegeln. Zusätzlich sind die  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Verhältnisse stark von den verfügbaren Elektronenakzeptoren abhängig (Snoep *et al.* 1990) und beeinflussen die Aktivität und Synthese von Enzymen (Snoep *et al.* 1993, de Graef *et al.* 1999). Die Synthese des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes in *E. coli* Stamm MC4100 wird durch die Redox-sensitive Regulation der Synthese der Untereinheit E2 (Dihydrolipoamid Transacetylase) kontrolliert (de Graef *et al.* 1999). Das Verhältnis  $\text{NAD}^+$  zu NADH stellt möglicherweise eine zelluläre Antwort auf die äußeren Redoxbedingungen dar (de Graef *et al.* 1999). Viele Enzyme anaerober Mikroorganismen, wie reduktive Dehalogenasen, sind sauerstoffempfindlich und werden durch  $\text{O}_2$  inhibiert oder inaktiviert (Neumann *et al.* 1996, Wohlfahrt & Diekert 1997, Imlay 2003, Pop *et al.* 2004). In diesem Zusammenhang ist die Erkennung einer aeroben oder anaeroben Umwelt, die durch bestimmte Redoxpotentiale gekennzeichnet ist, von großer Bedeutung. Allerdings können zelluläre Regulationssysteme und -mechanismen sowohl auf Redoxpotentiale (Fetzer & Conrad 1993, de Graef *et al.* 1999) als auch Sauerstoffkonzentrationen (Spiro & Guest 1990, Unden & Schirawski 1997) reagieren. Der aerobe, anaerobe und fermentative Stoffwechsel von *E. coli* steht unter der Kontrolle von mindestens drei globalen Regulatoren, deren Effekte von den Redoxbedingungen der Umgebung abhängig sind (Iuchi & Weiner 1996, de Graef *et al.* 1999). Der Regulator FNR (*Fumarat Nitrat Reductase Regulator*) ist ein Ein-Komponenten-System, das die



Genexpression von Enzymen des anaeroben Stoffwechsels aktiviert und des aeroben inhibiert (Spiro & Guest 1990, Uden & Trageser 1991; Green *et al.* 1996; Salmon *et al.* 2003). FNR reagiert dabei über seinen [4Fe-4S]-Cofaktor auf niedrige Sauerstoffkonzentrationen (1-5  $\mu\text{M}$ ) und reguliert die Expression der Zielgene (Uden & Schirawski 1997, Becker *et al.* 1996, Tseng *et al.* 1996). Dagegen kontrolliert Arc (*aerobic respiratory control*), ein Zwei-Komponenten-System, die Expression von Enzymen des aeroben Stoffwechsels (Iuchi & Lin 1993, Perrenoud & Sauer 2005). In dem System ist eine Transphosphorylierung von ArcA durch den Sensor ArcB involviert (Iuchi 1993, Iuchi *et al.* 1994). Das Nar-System, ebenfalls ein Zwei-Komponentensystem, kontrolliert die Expression von Genen der Nitrat- und Nitrit-Atmung unter anaeroben Bedingungen und inhibiert die Expression von Genen der Fumarat-Atmung. Dabei fungieren NarX/NarQ als Nitrat- und Nitritsensoren und aktivieren die Regulatoren NarL/NarP durch Phosphorylierung (Rabin & Stewart 1993).

Auch bei dem dehalogenierenden Bakterium *Desulfitobacterium dehalogenans* erfolgt die Regulation der *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase durch den redox-sensitiven Transkriptionsfaktor CprK (Smidt *et al.* 1999). Das Protein CprK zeigt signifikante Sequenzhomologien zu FNR (Fumarat Nitrat Regulatorprotein), FixK (oxidative Stressantwort) und CPR (cAMP Rezeptor Protein), als globale Regulatoren des anaeroben Stoffwechsels (Pop *et al.* 2004). Es konnte festgestellt werden, dass der Transkriptionsfaktor als Dimer vorliegt und mit hoher Affinität 3-Chlor-4-Hydroxyphenylacetat (CLOHPA), das Substrat der *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase (CprA), bindet. Unter reduzierenden Bedingungen liegen bei CrpK an zwei Cysteinresten freie SH-Gruppen vor und die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA und das Ablesen der *cpr*-Gene wird ermöglicht. Unter oxidierenden Bedingungen kann keine Bindung von CprK an die DNA erfolgen, da durch intermolekulare Disulfidbrücken keine DNA-Bindedomäne gebildet wird (Pop *et al.* 2006).

Ein weiterer Einfluss des Redoxpotentials auf Mikroorganismen kann darin bestehen, dass extrazelluläre redoxaktive Verbindungen mit den membranintegralen Elektronentransportketten interagieren (Bespalov *et al.* 1996, Aulenta *et al.* 2007). Das führt zu Änderungen des elektrochemischen Protonenpotentials und somit zu Änderungen der Energieausbeute aus einem Substrat. Zwecks einer optimalen Energieausbeute besitzt *E. coli* die Fähigkeit einer Redoxaxis. Dabei sind Veränderungen der Redoxbedingungen in der Umgebung mit Änderungen der protonenmotorischen Kraft verbundenen, die über eine

Regulationskaskade die Bewegung der Flagellen beeinflusst (Bespalov *et al.* 1996). Neben den Redoxbedingungen beeinflussen auch andere Umweltfaktoren, wie Sauerstoff oder verfügbare Elektronenakzeptoren, die protonenmotorische Kraft und bedingen eine Taxis der Mikroorganismen (Miller & Koshland 1977, Laszlo & Taylor 1981, Shioi & Taylor 1984, Shioi *et al.* 1988, Alexandre 2010).

Es ist vorstellbar, dass in *S. multivorans* Mechanismen existieren, die es ermöglichen, trotz eines positiven Redoxpotentials die Organohalid-Respiration auszuführen. Außerdem könnte durch die Reduktion des Mediums bei positiven  $E_{\text{SHE}}$  für den Organismus günstige Redox-Bedingungen geschaffen werden. Zum anderen wäre eine Verschiebung der internen Redox-Verhältnisse als Reaktion auf das zellumgebende Redoxpotential möglich. Um eine negative Beeinflussung des Stoffwechsels zu verhindern, könnten sich demzufolge Schutzmechanismen entwickelt haben. Regulationsmechanismen aufgrund der Redox-Bedingungen, sowohl auf Transkriptions- als auch auf Biosynthese-Ebene, konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei *S. multivorans* jedoch nicht gezeigt werden.

## 4.2. Sauerstoff als Elektronenakzeptor

Die biogeochemische Ausprägung eines kontaminierten Aquifers ist unter anderem vom Vorkommen verschiedener Elektronenakzeptoren und -donoren gekennzeichnet (Lovley 2001, Winderl *et al.* 2008). Die Fähigkeit der Mikroorganismen, diese Energiesubstrate zu nutzen, unterscheidet sich von Art zu Art und bestimmt somit die Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft. Eine große Bedeutung als Elektronenakzeptor besitzt der Sauerstoff, der naturgemäß nur von aeroben Mikroorganismen genutzt werden kann. Die reduktive Dehalogenierung ist ein anaerober Prozess, der durch Sauerstoff gehemmt wird (Sharma & McCarthy 1996). Allerdings erfolgt durch die Aktivität aerober Mikroorganismen ein schneller Verbrauch des vorhandenen Sauerstoffs und die Ausbildung eines anaeroben Milieus (Lovley 2001, Winderl *et al.* 2008, Bombach *et al.* 2010). Dennoch ist davon auszugehen, dass auch anaerobe Mikroorganismen zumindest zeitweise mit Sauerstoff in Berührung kommen. In zahlreichen Arbeiten der vergangenen Jahre wurden Erkenntnisse zur Sauerstoff-Toleranz anaerober Bakterien gewonnen (Kawasaki *et al.* 2005, Imlay 2008, Riebe *et al.* 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstum von *S. multivorans* in geschlossenen Kultivierungsflaschen in anaerobisiertem Flüssigmedium mit Pyruvat (40 mM) als

Elektronendonator bei 28 °C untersucht. Dem anaerobisierten Gasraum wurden vor dem Animpfen unterschiedliche Konzentrationen an Sauerstoff zugefügt. Eine optimale Verteilung des Sauerstoffs in der flüssigen Phase wurde durch Schütteln der Kultivierungsflaschen gewährleistet.

Obwohl *S. multivorans* als strikt anaerob beschrieben worden ist (Neumann *et al.* 1994), konnte eine Toleranz gegenüber von bis zu 20 % O<sub>2</sub> in der Gasphase gezeigt werden. In Verbindung mit Pyruvat als Elektronendonator konnte Wachstum von *S. multivorans* in Gegenwart von O<sub>2</sub> beobachtet werden. Sauerstoff wird dabei von *S. multivorans* offenbar als Elektronenakzeptor genutzt, da eine Abnahme der O<sub>2</sub>-Konzentration während der Kultivierung gemessen wurde. Anaerobes Wachstum mit Pyruvat als alleinigem Substrat war nicht möglich (Abbildung 22, Seite 55, Neumann *et al.* 1994). Es erfolgte ein reproduzierbares Wachstum nur unter limitierenden O<sub>2</sub>-Konzentrationen in geschlossenen Systemen. Damit konnte kein Sauerstoff in die Flaschen nachströmen und sofern dieser verbraucht wurde, sank die Konzentration während des Wachstums. Welche O<sub>2</sub>-Konzentrationen dabei tatsächlich im Medium vorlagen, müsste in weiterführenden Experimenten noch bestimmt werden. Die maximale Zelldichte erreichte die *S. multivorans*-Kultur bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 10 % in der Gasphase. Höhere Konzentrationen schienen jedoch das Wachstum zu inhibieren. Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei *S. multivorans* um ein mikroaerobes Bakterium handelt. Dies steht auch im Einklang damit, dass bisher alle anderen bekannten Vertreter der Gattung *Sulfurospirillum* zumindest als mikroaerophil eingestuft wurden (Finster *et al.* 1997, Luijten *et al.* 2003). Beispielweise kann *S. arcachonense* mit bis zu 15 % Sauerstoff in der Gasphase und Succinat als Elektronendonator wachsen (Finster *et al.* 1997). Auch die mit *Sulfurospirillum* spp. nah verwandten nicht dechlorierenden *Campylobacter* spp. sind als mikroaerophil beschrieben worden (Goodhew *et al.* 1998, Smith *et al.* 1999).

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Dechlorierung von PCE in Verbindung mit Elektronendonator Pyruvat auch in Anwesenheit von 10 % O<sub>2</sub> im Gasraum stattfand. Das stand zunächst im Widerspruch zu den Beobachtungen, dass die reduktive Dechlorierung nur unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden kann (Sharma & McCarthy 1996). Allerdings setzte der Umsatz von PCE erst ab einem Sauerstoffgehalt von < 5 % ein. Das spricht für eine Inhibition der Dechlorierung bei höheren O<sub>2</sub>-Konzentrationen. Hingegen konnte eine deutlich stärkere Hemmung der Organohalid-Respiration mit Formiat als Elektronendonator

durch Sauerstoff festgestellt werden. Eine Ursache für die geringere Toleranz gegenüber Sauerstoff könnte bei der Formiat-Dehydrogenase liegen, die als sauerstoffempfindlich beschrieben wurde (Schmitz & Diekert 2003). Die ATP-Synthese erfolgt unter diesen Bedingungen über Elektronentransportphosphorylierung (Miller *et al.* 1997), sodass die aus der Oxidation des Formiats stammenden Elektronen entweder auf PCE oder Sauerstoff übertragen werden können. Die zunehmende Zelldichte von *S. multivorans* mit steigender O<sub>2</sub>-Konzentration beim Wachstum in Pyruvat-haltigem Medium lässt den Schluss zu, dass Sauerstoff mit Energiegewinn reduziert wird.

Die Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA wird in anaeroben Mikroorganismen durch die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) katalysiert (Uyeda & Rabinowitz 1971, Charon *et al.* 1999). Damit könnte bei Verwendung der Substrate Pyruvat und PCE Ferredoxin als Elektronenüberträger zur PCE-Dehalogenase agieren. Miller *et al.* (1996) isolierten Ferredoxin aus *S. multivorans* und bestimmten dessen Redoxpotential auf -445 mV. Allerdings betrug die Aktivität der PCE-Dehalogenase im verwendeten Enzymtest mit Ferredoxin als Elektronendonator nur 1 % im Vergleich zum künstlichen Elektronendonator Methylviologen (Miller *et al.* 1996). Somit ist eine direkte Übertragung von Elektronen von Ferredoxin auf die PCE-Dehalogenase eher unwahrscheinlich. Dafür kommt nur ein weiterer Elektronenüberträger mit einem niedrigen Redoxpotential von  $\leq -400$  mV infrage, um den Cofaktor der PCE-Dehalogenase reduzieren zu können (Siebert 2002). Ein solcher Elektronenüberträger konnte jedoch bisher noch nicht bei der Organohalid-Respiration nachgewiesen werden (Schmitz & Diekert 2003, John *et al.* 2007). Die gemessenen Aktivitäten des Enzyms im Zellextrakt von *S. multivorans* waren geringer in Anwesenheit von Sauerstoff. Diese steht im Einklang mit bisherigen Erkenntnissen, die besagen, dass die PFOR Sauerstoff-sensitive Eisen-Schwefel-Zentren enthält (Pan & Imlay 2001).

Beim Wachstum von *S. multivorans* mit Pyruvat als Elektronendonator und O<sub>2</sub> ± PCE als Elektronenakzeptoren konnte die Bildung von H<sub>2</sub> beobachtet werden. Dieses setzte erst nach Verbrauch der Elektronenakzeptoren ein. Offenbar werden Elektronen vorrangig zur Reduktion von Sauerstoff- und PCE übertragen bevor eine Übertragung zur Hydrogenase erfolgt.

Das Genom von *S. multivorans* war zum Zeitpunkt des Anfertigen dieser Dissertationsschrift zum größten Teil sequenziert (Schubert T, Adrian L, Tarkka M, Wubet T, Diekert G, unpubliziert) und wurde über RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*;

<http://rast.nmpdr.org>; Aziz *et al.* 2008) automatisch annotiert. Damit bot sich die Möglichkeit, das Genom von *S. multivorans* auf das Vorkommen von Genen für Enzyme zur Reduktion und Entgiftung von O<sub>2</sub> bzw. ROS Enzyme zu überprüfen.

Im Genom von *S. multivorans* (Schubert *et al.*, unveröffentlicht) befindet sich ein Gen für eine Cytochrom *c*-Oxidase, die auch mittels eines Schnelltests in den Zellen nachgewiesen werden konnte. Das unterstützt die Beobachtung, dass Sauerstoff von *S. multivorans* als terminaler Elektronenakzeptor genutzt wird. Weiterhin konnten in *S. multivorans* Chinone nachgewiesen werden (Krauter 2006). Beim Wachstum von *S. multivorans* mit Pyruvat/O<sub>2</sub> findet wahrscheinlich eine Übertragung von Reduktionsäquivalenten von der PFOR auf die Komponenten der Atmungskette (Chinone, Cytochrom *c*-Oxidase [Rich 2003]) statt. Allerdings bleibt die Frage offen, welcher Elektronenüberträger zwischen PFOR/Ferredoxin Cytochrom *c*-Oxidase vorzufinden ist. Die Möglichkeit der Pyruvatoxidation durch einen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex muss ausgeschlossen werden, da keine entsprechende Enzymaktivität gemessen wurde (Gaspar 2010) und im Genom von *S. multivorans* (Schubert *et al.*, unveröffentlicht) kein Gen für die Pyruvat-Dehydrogenase vorhanden ist. Außerdem ist dieser Enzymkomplex charakteristisch für aerobe Organismen (Reed & Willms 1966, de Kok *et al.* 1998, Murarka *et al.* 2010). Weiterhin besitzt der Organismus ein Gen für eine Pyruvat-Oxidase, welche die Reaktion von Pyruvat, O<sub>2</sub> und Phosphat zu Acetyl-Phosphat, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert.

Im Hinblick auf die Reduktion von Sauerstoff besitzt *S. deleyianum* Gene (unpubliziert) für eine ähnliche Enzymausstattung wie *S. multivorans*. Das stärkt zusätzlich die These, dass die Gattung *Sulfurospirillum* mikroaerophil und zur Nutzung von O<sub>2</sub> als terminalen Elektronenakzeptor befähigt ist. (Finster *et al.* 1997, Luijten *et al.* 2003, Jensen & Finster 2005)

Eine Bilanzierung des Substratumsatzes von Pyruvat, O<sub>2</sub> und PCE steht noch aus. Insbesondere konnte die Bildung von Kohlenstoffdioxid nur qualitativ belegt werden. Die Freisetzung von Acetat könnte auf einen Abbau des Acetyl-CoA aus der Reaktion der PFOR (Uyeda & Rabinowitz 1971) über Acetyl-Phosphat hindeuten (Ingram-Smith *et al.* 2006). Im Genom von *S. multivorans* (Schubert *et al.*, unpubliziert) konnten die Gene für Acetatkinase und Phosphotransacetylase identifiziert werden. Der fermentative Abbau von Pyruvat zu Lactat konnte in den Experimenten nicht beobachtet werden, obwohl *S. multivorans* das Gen

für eine Lactatdehydrogenase besitzt (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995, Schubert *et al.*, unpubliziert).

Im Genom von *S. multivorans* konnten alle Gene für die Enzyme des oxidativen Citrat-Zyklus, bis auf das Gen für die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase, nachgewiesen werden (Schubert *et al.*, unpubliziert). Weiterhin wurden die Gene für die  $\alpha$ -Ketoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase und ATP-Citrat-Lyase identifiziert. Auch in *S. deleyanum* konnten die Gene für diese Enzyme nachgewiesen werden (unpubliziert). Damit besteht die Möglichkeit einer vollständigen Oxidation von Pyruvat im Citratzyklus. In einer parallel angefertigten Arbeit erfolgte eine nähere Charakterisierung zur möglichen vollständigen Oxidation des Pyruvates zu CO<sub>2</sub> in *S. multivorans* (Gaspar 2010). Darin wurden Schlüsselenzyme des Citrat-Zyklus ( $\alpha$ -Ketoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, Succinat-Dehydrogenase [Else *et al.* 1988], Malat-Dehydrogenase [Munujos *et al.* 1993]) bestimmt (Gaspar 2010). Eine aktive  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase konnte nicht gefunden werden (vorliegende Arbeit und Gaspar 2010). Allerdings kann die  $\alpha$ -Ketoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase die Reaktion in beide Richtungen katalysieren (Mai & Adams 1996) und damit die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase im oxidativen Citratzyklus ersetzen (Baughn *et al.* 2009). Die gemessene Aktivität der Malat-Dehydrogenase, deren chemisches Gleichgewicht in Richtung Oxalacetat liegt, stützt die Hypothese eines geschlossenen oxidativen Citratzyklus (Berg *et al.* 2007).

### 4.3. O<sub>2</sub>-entgiftende Enzyme

Neben den zur Reduktion von molekularem Sauerstoff befähigten Enzymen konnten Aktivitäten von weiteren Enzymen zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) gemessen werden. So waren in Zellextrakten folgende Enzyme aktiv: Katalase und Superoxid-Dismutase. Solche Enzymsysteme sind für Organismen, die in Gegenwart von O<sub>2</sub> lebensfähig sind, essentiell, da sie zellschädigende ROS entgiften (Imlay 2003, Imlay 2008). Das Vorkommen und die Aktivitäten ROS-entgiftender Enzyme bestimmt dabei mit, welche Sauerstoffkonzentrationen vom Organismus toleriert werden können (Imlay 2003, Riebe *et al.* 2007).

Es wurde eine aktive NADH-Oxidase im Zellextrakt von *S. multivorans* bestimmt. Anaerobe Mikroorganismen nutzen dieses Enzym zur Reduktion von molekularem Sauerstoff (Küsel *et al.* 2001, Karnholz *et al.* 2002). Die Aktivität von NADH-Oxidasen konnte beispielsweise bei verschiedenen *Desulfovibrio* spp. (van Niel & Gottschal 1998) und *Clostridium glycolicum*

RD-1 nachgewiesen werden (Küsel *et al.* 2001). Bei *D. gigas* und *D. desulfuricans* CSN ist die Reduktion von O<sub>2</sub> an den Energiegewinn in Form von ATP gekoppelt (Dilling & Cypionka 1990, Santos *et al.* 1993). Die gemessenen Aktivitäten lagen allerdings im Vergleich zu anderen anaeroben Mikroorganismen deutlich niedriger. Das könnte eine Ursache für die Intoleranz gegenüber aeroben Umweltbedingungen sein (Imlay 2003), da so von *S. multivorans* nur niedrige Konzentrationen von ROS katalysiert werden können. Das Genom von *S. multivorans* (Schubert *et al.*, unpubliziert) enthält ein Katalase-Gen und zwei verschiedene Superoxid-Dismutase-Gene (SOD [Fe], SOD [Cu-Zn]).

In *S. multivorans* konnte im Vergleich zum anaeroben *Acetobacterium dehalogenans* (Hufnagel 2008) nur eine sehr geringe spezifische Aktivität der NADPH-Peroxidase bestimmt werden. Da im Genom kein Gen für eine NADPH-Peroxidase gefunden wurde, muss davon ausgegangen werden, dass in dem Messansatz eine unspezifische Reaktion verfolgt wurde. Dagegen befinden sich verschiedene Gene für andere Peroxidase-Typen im Genom von *S. multivorans*. Dazu zählen eine Cytochrom c555-Peroxidase (Yamanaka & Okunuki 1963, Yamanaka & Okunuki 1970) sowie Komponenten der Thiol-Peroxidase (Comtois *et al.* 2003, La Carbona *et al.* 2007) und Gluthation-Peroxidase (Gille & Sigler 1995, Riboulet *et al.* 2007). Weiterhin konnten zusätzliche Gene von Proteinen, die eine Funktion in der oxidativen Stressantwort haben, identifiziert werden. Dazu zählen Rubrerythrin (Fournier *et al.* 2003, Kawasaki *et al.* 2005, Imlay 2008) und Peroxidstress-Regulator (van Vliet *et al.* 1999). Diese Daten und die experimentellen Messungen unterstützen die Beobachtung, dass *S. multivorans* in Gegenwart von Sauerstoff überlebensfähig ist.

#### **4.4. Einfluss alternativer Elektronenakzeptoren auf die reduktive**

##### **Dechlorierung**

Zahlreiche anaerobe Organismen nutzen neben halogenierten Verbindungen auch andere Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Eisen und Sulfat. In Feldstudien an kontaminierten Standorten konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit bestimmter alternativer Elektronenakzeptoren die reduktive Dechlorierung negativ beeinflusst (Christensen *et al.* 2000, Winderl *et al.* 2007, Anneser *et al.* 2008). Das Bakterium *S. multivorans* kann neben PCE und TCE unter anderem auch Nitrat sowie Fumarat als Elektronenakzeptoren nutzen (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995). Auch andere Vertreter der Gattung *Sulfurospirillum* spp. nutzen verschiedene Elektronenakzeptoren (Luijten *et al.* 2003, Kodama *et al.* 2007). In der

vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Dechlorierung von PCE auch in Anwesenheit eines zusätzlichen Elektronenakzeptors stattfand. In Verbindung mit Pyruvat als Elektronendonator erfolgte der Verbrauch von Fumarat oder Nitrat parallel zum Abbau von PCE. Das steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Neumann *et al.* (1994), die eine starke Inhibition der Dechlorierung von PCE in Zellsuspensionen und wachsenden Kulturen in Anwesenheit von Fumarat aufzeigten. Succinat, das Produkt der Fumarat-Reduktion, hingegen wirkte nicht inhibierend auf die Dehalogenierung (Neumann *et al.* 1994). In diesem Zusammenhang wurde angenommen, dass Fumarat und PCE als Elektronenakzeptoren um Reduktionsäquivalente von einem gemeinsamen Elektronendonator konkurrieren (Neumann *et al.* 1994). Die Verwendung von Fumarat und PCE führte in der vorliegenden Arbeit zu einer höheren Zelldichte als bei Fumarat ohne PCE. Das deutet darauf hin, dass die Dechlorierung von PCE unter Energiegewinn für *S. multivorans* stattfand. Im Gegensatz dazu war das Wachstum von *S. multivorans* bei Verwendung von Nitrat und PCE im Vergleich zu Nitrat ohne PCE deutlich gehemmt. Hier scheint die Verwertung beider Elektronenakzeptoren gegenseitig gehemmt zu sein. Bisher war bekannt, dass *S. multivorans* Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen kann (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995). Allerdings sind zu einer Beeinflussung der Dehalogenierung von PCE keine detaillierten Daten bekannt. Des Weiteren wäre es denkbar, dass die Produkte der Nitratreduktion Nitrit und Ammonium inhibierend auf die Dechlorierung wirken. Von Nitrit ist bekannt, dass es toxisch auf viele Bakterien wirkt (Rowe *et al.* 1979, Yarbrough *et al.* 1980). Auch beim dehalogenierenden *Enterobacter* Stamm MS-1 wurde die Dechlorierung von PCE durch Nitrat und Sauerstoff komplett gehemmt (Sharma & McCarthy 1996). Dagegen hatten bei diesem fakultativen Bakterium Fumarat und Sulfat keinen Einfluss auf den Abbau von PCE.

Pyruvat dient als Elektronendonator für die Dechlorierung von PCE in *S. multivorans* (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995). In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass die Dechlorierung von PCE zum „Ableiten“ von Elektronen dient, wenn bei der Oxidation des Elektronendonors (z. B. Pyruvat) Energie durch Substratstufenphosphorylierung gewonnen werden kann (John *et al.* 2006). Scholz-Muramatsu *et al.* (1995) beobachteten, dass das Wachstum von *S. multivorans* mit Pyruvat als alleinigem Substrat nicht möglich ist. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass *S. multivorans* mit Fumarat als alleinigem Substrat zu fermentativem Wachstum befähigt ist. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass auch bei der Substratkombination Fumarat/PCE Dechlorierung stattfand.



Die mit *S. multivorans* durchgeführten Untersuchungen lassen keine vorrangige Nutzung eines bestimmten Elektronenakzeptors erkennen. Scheinbar werden mehrere Substrate gleichzeitig verwertet. Dabei konkurrieren die terminalen Reduktasen um die Elektronen aus dem oxidativen Teil des Energiestoffwechsels. Dagegen wurde bei *E. coli* eine Hierarchie in der Nutzung von verschiedenen Elektronenakzeptoren festgestellt, die von ATP-Ausbeute und Wachstumsertrag abhängig ist (Unden & Bongaerts 1997). Allerdings bestimmt nicht nur die maximale Energieausbeute die Reihenfolge der verwendeten Elektronenakzeptoren. *Wollinella succinogenes* kann zahlreiche Substrate verwerten, wie Nitrat, Nitrit, Fumarat, DMSO, oder Polysulfid (Lorenzen *et al.* 1993, Lorenzen *et al.* 1994). Jedoch nutzt es vorrangig Polysulfid, dass die geringste Energieausbeute erreicht allerdings dem Bakterium ökologische Vorteile verschafft (Unden & Bongaerts 1997).

Neben dem Elektronenakzeptor bestimmt auch die Verfügbarkeit eines Elektronendonors die Dechlorierungsaktivität mit halogenierten Alkenen (Liu & Suflita 1993, Holliger 1995, Smidt & de Vos 2004). Dabei besitzt *S. multivorans* die Fähigkeit Pyruvat, Lactat, Glycerol, Formiat und H<sub>2</sub> als Elektronendonoren zur Dechlorierung von PCE zu nutzen (Scholz-Muramatsu *et al.* 1995). Ein weiterer Vertreter der Gattung, *S. halospirans*, kann bis auf Ethanol und Glycerol die gleichen Substrate verwerten (Luijten *et al.* 2003). Dabei spielen in kontaminierten Standorten vor allem Acetat und Wasserstoff eine wichtige Rolle als Elektronendonoren in der kompletten Mineralisation von PCE (Smidt & de Vos 2004).

#### 4.5. Langzeitregulation der PCE-Dehalogenase

Entgegen früheren Erkenntnissen (Neumann *et al.* 1996) konnte in aktuelleren Arbeiten gezeigt werden, dass das Gen der PCE-Dehalogenase aus *S. multivorans* nicht konstitutiv exprimiert wurde, sondern bei der Kultivierung mit den Substraten Pyruvat und Fumarat (jeweils 40 mM) einer Langzeitregulation unterlag (John & Rubick *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden Aktivität, Biosynthese und Expression der PCE-Dehalogenase bei der Kultivierung mit verschiedenen Elektronenakzeptoren untersucht. Dabei unterschieden sich die Zeiträume (Anzahl Subkultivierungen/Generationen), nachdem eine Abnahme der Enzymaktivität gemessen wurde (Tabelle 13, Abschnitt 3.5.1., Seite 72), je nach der verwendeten Medienzusammensetzung. Eine deutliche Abnahme der Enzymaktivität (< 50 %) war erst nach mindestens 45 Generationen (15 Subkultivierungen) und ein vollständiger Verlust der Aktivität nach mindestens 60 Generationen (20 Subkultivierungen)

zu sehen. Parallel dazu konnte ein Rückgang der Biosynthese von PceA und die Einstellung der Transkription von *pceA* nachgewiesen werden. Dabei wurde festgestellt, dass unabhängig vom verwendeten Substrat in Abwesenheit von PCE oder TCE eine Langzeitregulation der PCE-Dehalogenase von *S. multivorans* erfolgte. Offenbar handelt es sich bei der Regulation der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* um einen Langzeiteffekt (John & Rubick *et al.* 2009), der reproduzierbar ist.

Jedoch konnten auch Ausnahmen von dieser Annahme beobachtet werden. Die Abnahme der PceA-Aktivität in Anwesenheit von Nitrat könnte auf eine Inhibition des Enzyms durch das Substrat bzw. ein Produkt der Nitratreduktion hindeuten. Neumann *et al.* (1996) beschreiben eine Stimulation der Enzymaktivität von gereinigtem PceA, wenn dem Enzymtest  $\text{NH}_4^+$  zugesetzt wurde. Dabei wurde eine maximale spezifische Aktivität bei 4 mM  $\text{NH}_4^+$  erreicht. In der stationären Wachstumsphase befand sich im Medium circa 5 mM Ammonium, sodass davon kein inhibierender Einfluss auf die Enzymaktivität von PceA ausgehen dürfte. Zusätzlich wurde ca. 10 mM Nitrit im Medium bestimmt. Von Nitrit ist bekannt, dass es die PCE-Dehalogenase im Enzymtest hemmt (Neumann *et al.* 1995). Nitrit kann mit Thiol-Gruppen zu Nitrosothiolen reagieren und dadurch Enzyme inhibieren (O'Leary & Solberg 1976). Waren PCE und TCE, im Kultivierungsmedium vorhanden, konnte keine Abnahme der Enzymaktivität von PceA festgestellt werden. Da es sich bei diesen Alkenen um die Substrate von PceA handelt (Neumann *et al.* 1995, 1996), ist dieses Ergebnis nicht überraschend. So konnte bei cDCE, das von der PCE-Dehalogenase nicht reduziert werden kann, ebenfalls eine Langzeitregulation von PceA festgestellt.

Da der Verlust der Aktivität von PceA mit dem Einstellen der Transkription von *pceA* verbunden ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine Regulation auf Transkriptionsebene handelt. Allerdings ist eine solche generationsübergreifende Regulation schwer zu erklären, da eine Reaktion des Organismus (Einstellen der *pceA* Expression) erst über 100 Generationen nach dem Ereignis (Substrat nicht vorhanden) eintritt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es sich um einen epigenetischen Effekt handelt. Dieser ist auf eine vererbte Änderung der Genexpression, die nicht auf einer veränderten DNA-Sequenz beruht, zurückzuführen (Casadesús & Low 2006). Die molekularen Mechanismen solcher epigenetischen Phänomene liegen hauptsächlich in DNA-Methylierungsmustern oder in Modifikationen von Histon-artigen Proteinen (Casadesús & Low 2006). Dadurch kann eine schnelle Reaktion und Anpassung von Zellen auf eine veränderte Umwelt erfolgen, die an

Tochterzellen weitergegeben wird (True *et al.* 2004, Casadesús & Low 2006). Eine epigenetische Modifikation betrifft häufig strukturelle Komponenten der Bakterienzelle, weniger Enzyme des Stoffwechsels (Guespin-Michel & Kaufman 2001). Beispielsweise bildet ein pathogener *E. coli*-Stamm zwei Variationen des Pilus, die durch DNA-Modifikationen gesteuert werden (Abraham *et al.* 1985, Casadesús & Low 2006). Eine Analyse des *pceA* Gens inklusive stromaufwärts liegender DNA-Sequenzen konnte zwischen  $PceA^+$  und  $PceA^-$ -Zellen in einer Langzeitkultivierung keine signifikant unterschiedliche Methylierungsmuster offenbaren. Die Vererbung von Merkmalen durch epigenetische Regulationen erfolgt in der Regel nur über wenige Generationen hinweg (Casadesús & Low 2006). Das spricht gegen eine epigenetische Kontrolle der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans*.

Zur Regulation der reduktiven Dehalogenasen ist noch nicht viel bekannt. Jedoch zeichnet sich ab, dass viele unterschiedliche Regulationsmechanismen verbreitet sind (Smidt & de Vos 2004, Futagami *et al.* 2008, John & Rubick *et al.* 2009). Beim gram-positiven PCE-dechlorierenden *Desulfitobacterium hafniense* Stamm Y51 wird das *pce* Operon von Transposons flankiert (Futagami *et al.* 2006). Bei der Langzeitkultivierung von *D. hafniense* Stamm Y51 und Stamm PCE-S konnte nur in Anwesenheit von PCE als einzigem Elektronenakzeptor eine relativ konstante PCE-Dehalogenase-Aktivität nachgewiesen werden (Reinhold 2008). Fehlte PCE oder waren andere Elektronenakzeptoren anwesend, kam es zu einem Aktivitätsverlust zwischen 20 und 70 Subkultivierungen. Beim *D. hafniense* Stamm PCE-S ging der Verlust der Enzymaktivität mit dem Rückgang der Biosynthese der PCE-Dehalogenase einher. In beiden Stämmen sank der Gehalt an Corrinoïden parallel zum Verlust der *PceA*-Aktivität. Durch PCE ließ sich die Enzymaktivität wieder induzieren (Reinhold 2008). Diese Beobachtungen bei *D. hafniense* Stamm Y51 widersprechen allerdings denen von Suyama *et al.* (2002). Hier wurde der Verlust der *PceA*-Aktivität in Anwesenheit von PCE und cDCE beobachtet. Allerdings beruhte das auf einem Verlust des Transposons und die Expression konnte nicht wieder induziert werden. Trotz dieser unterschiedlichen Beobachtungen scheint die PCE-Dehalogenase bei *D. hafniense* Stamm Y51 und PCE-S auch einer Langzeitregulation unterworfen zu sein, der offensichtlich andere Mechanismen zugrunde liegen als bei *S. multivorans*. In *S. multivorans* dagegen bleibt das *pceA* Gen in  $PceA^-$ -Zellen funktionstüchtig erhalten und ist mit PCE sowie TCE induzierbar. Das konnte mittels Kolonie-PCR (John & Rubick *et al.* 2009) und Induktionsversuchen mit Einzelkolonien nachgewiesen werden. Zusätzlich befinden sich keine IS Elemente oder

Transposase-Gene in räumlicher Nähe des *pceAB* Operons in *S. multivorans*. Bei *Desulfitobacterium dehalogenans* und *D. hafniense* Stamm DCB-2 ist die Expression des Gens der *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase induzierbar und wird durch einen Transkriptionsaktivator (*cprK/cprK1*) vom CRP/FNR-Typ reguliert (Smidt *et al.* 2000, Körner *et al.* 2003, Gábor *et al.* 2006, Pop *et al.* 2006). Das Operon der PCE-Dehalogenase in *Desulfitobacterium* ssp. Stamm KBC1 dagegen enthält ein Gen für einen Transkriptionsregulator PrdK, der zur CAP Familie gehört (Tsukagoshi *et al.* 2006). Aus der Analyse der Genomsequenz von *Dehalococcoides ethenogenes* wurde ein Modell zur Regulation der reduktiven Dehalogenase vorhergesagt (Seshadri *et al.* 2005). Dabei wurde ein Zwei-Komponenten Signaltransduktions-System postuliert, dessen funktionelle Charakterisierung noch aussteht.

Die Mechanismen, denen die Langzeitregulation von PceA zugrunde liegt, könnten auch mit der Biosynthese des Cobalamin-Cofaktors zusammenhängen (John 2007). Grundlage dieser Annahme ist, dass PceA<sup>-</sup>-Zellen einen 60fach reduzierten Norpseudovitamin-B<sub>12</sub>-Gehalt vorwiesen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der nichtdechlorierende *S. multivorans* Stamm N nicht zur Biosynthese von Norpseudovitamin-B<sub>12</sub> befähigt ist und in den Zellen kein PceA nachweisbar war (Siebert *et al.* 2002). Dabei besitzt der Stamm das vollständige *pceA* Gen, dessen Transkription belegt wurde. Infolgedessen wurde von Siebert *et al.* (2002) ein Einfluss des Corrino-Cofaktors auf die Biosynthese des PceA-Apoproteins vermutet. In *Salmonella typhimurium* sind Transkription der B<sub>12</sub>-Biosynthese-Gene und das B<sub>12</sub>-abhängige Enzym Propandioldehydratase koreguliert. Die Gene sind durch ein Gen für einen Transkriptionsfaktor getrennt, der die Expression kontrolliert (Roth *et al.* 1996). Unter Kultivierungsbedingungen ohne Zusatz von Vitamin B<sub>12</sub> im Medium muss *S. multivorans* Norpseudovitamin-B<sub>12</sub> selbst synthetisieren. Dabei wurden eine drastische Abnahme der Aktivität von PceA nach 45 Generationen (15 Subkultivierungen) und ein Verlust nach 60 Generationen (20 Subkultivierungen) beobachtet. Ob dieser verkürzte Zeitraum der Langzeitregulation signifikant ist, kann zur Zeit nicht hinreichend beantwortet werden. Die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Fumarat und PCE (Neumann *et al.* 1994) lassen zumindest Raum für Spekulationen offen, ob Fumarat einen Einfluss auf die Langzeitregulation der PCE-Dehalogenase ausübt. Eine Verdopplung der Fumaratkonzentration im Kultivierungsmedium führte nur zu einer leichten Verlängerung des Zeitraumes nachdem keine PceA-Aktivität mehr messbar war. Somit muss ein Einfluss

des Elektronenakzeptors Fumarat eher ausgeschlossen werden. Eine Langzeitkultivierung in Abwesenheit von PCE (20 mM Pyruvat, 20 mM Fumarat) wurde auch mit dem dechlorierenden *S. halorespirans* (Luijten *et al.* 2003) durchgeführt. In dem Untersuchungszeitraum von 150 Generationen (50 Subkultivierungen) konnte eine Reduzierung der PCE-Dehalogenase-Aktivität nach 60 Generationen (20 Subkultivierungen) festgestellt werden, jedoch kein Verlust der Enzymaktivität. Scheinbar existieren verschiedene Arten der Regulation der PCE-Dehalogenase selbst bei zwei Vertretern derselben Gattung.

Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von PCE (Neumann *et al.* 1994) besteht die Möglichkeit, dass die Verbindung in den Membranen eingelagert wird und über einen längeren Zeitraum präsent ist. Das könnte zu einer verzögerten Abnahme der PceA-Aktivität führen. Gegen diese Annahme sprechen jedoch die folgenden Messungen und Berechnungen. Bei der Kultivierung von *S. multivorans* mit Pyruvat und PCE werden beide Substrate vollständig verbraucht ( $< 1 \mu\text{M}$ ). Nach fünf Subkultivierungen (10 % Inokulum) in Abwesenheit von PCE können nur deshalb maximal 10 pM PCE oder TCE im Medium vorhanden sein, jedoch lag die Enzymaktivität noch bei 90 % der Ausgangsaktivität. Die minimale Induktor-Konzentration lag für PCE bei 3  $\mu\text{M}$  und TCE bei 7  $\mu\text{M}$  Zellen von *S. multivorans*, die in Anwesenheit von PCE kultiviert wurden, akkumulierten in der späten exponentiellen Wachstumsphase höchstens 5  $\mu\text{M}$  PCE oder TCE ( $4 \cdot 10^{11}$  Zellen pro Liter). Das entspräche nach 10 Subkultivierungen einem PCE- oder TCE-Molekül pro 1000 Zellen. Auf Grundlage dieser Berechnungen kann eine Induktion von PceA durch Verunreinigungen an PCE oder TCE ausgeschlossen werden (John & Rubick *et al.* 2009).

#### 4.6. Proteomanalysen

Die durchgeführte Proteomanalyse der 2D-PAGE-Versuche hatte das Ziel, die Proteinmuster aus verschiedenen Kultivierungsexperimenten zu vergleichen. Dabei sollte der Fragestellung nachgegangen werden, welchen Einfluss unterschiedliche Substrate auf die Biosynthese der Proteine ausüben. Die Auswertung einiger ausgewählter Proteinspots ließ jedoch keine Rückschlüsse auf regulatorische Funktionen zu. Allerdings gelang der Nachweis, dass PceB, der putative Membrananker von PceA (Neumann *et al.* 1998), in den Zellen vorlag. Weiterhin konnten in PceA<sup>+</sup>-Zellen jeweils 3 Spots mit unterschiedlichen pI-Werten und gleicher Größe der PCE-Dehalogenase zugeordnet werden (Abbildung 43, Seite 85). Bei

Zellen aus der Langzeitkultivierung ohne PCE wurden keine PCE-Dehalogenase gefunden. Die Analyse der Genomsequenz von *S. multivorans* ergab (Schubert *et al.*, unpubliziert), dass sich stromabwärts von *pceAB* ein weiteres Operon mit einem Gen, das eine 73%ige Sequenzähnlichkeit zu *pceA* hat, befindet. In diesem zweiten Operon ist ein weiteres Gen mit einer 99%igen Sequenzähnlichkeit zu *pceB* lokalisiert. Die Expression dieser zwei verschiedenen *pceA* Gene könnte eine mögliche Erklärung für zumindest zwei Proteinspots aus den 2D-PAGE Versuchen sein. In der Gattung *Dehalococcoides* konnten über 90 homologe Gene für reduktive Dehalogenasen in den Genomen identifiziert werden (Hölscher *et al.* 2004, Kube *et al.* 2005, Seshadri *et al.* 2005). Viele dieser putativen Dehalogenase-Gene werden in *D. ethenogenes* Stamm 195 bei Kultivierung mit PCE, TCE oder gleichzeitig transkribiert (Fung *et al.* 2007). Allerdings müsste bei *S. multivorans* in zukünftigen Experimenten die Expression beider *pce*-Operons und Biosynthese beider PceA- und PceB-Proteine nachgewiesen werden.

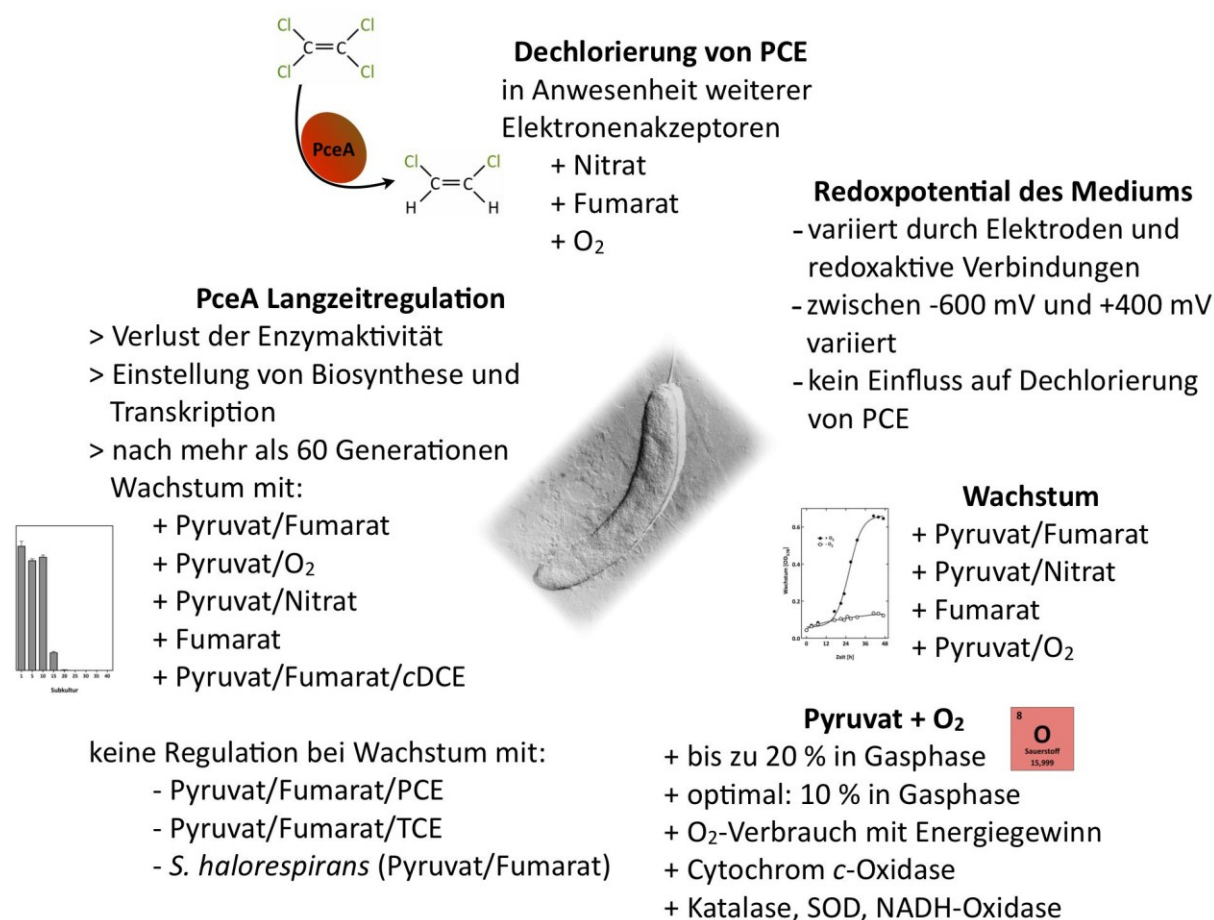
Zusätzlich zu den 2D-PAGE-Proteomanalysen, sollten anschließende Untersuchungen zunächst die Membranproteine von *S. multivorans* im Hinblick auf eine respiratorische Funktion mittels 1D PAGE untersucht werden. Von großem Interesse ist hierbei auch die Identifizierung von elektronenübertragenden Proteinen der Organohalid-Respiration, die bisher noch aussteht (Schmitz & Diekert 2003, John *et al.* 2006). Allerdings erwies es sich als notwendig, die Solubilisierung und Trennung der Membranproteine für künftige Untersuchungen zu optimieren. Dennoch gelang es, Hydrogenase, Formiat-Dehydrogenase und Reduktasen (Fumarat, Nitrat, PCE) der verwendeten Substrate zu identifizieren. Weiterhin konnten verschiedene Bestandteile von Atmungsketten (ATPase, NADH-Dehydrogenase, Cytochrom *c*-Oxidase) zugeordnet werden. Jedoch scheint, mit Ausnahme der PCE-Dehalogenase, keines dieser Enzyme einer substratabhängigen Regulation zu unterliegen. Dies steht auch im Einklang mit den Enzymaktivitätsmessungen der Nitrat- und Fumarat-Reduktase in langzeitkultivierten Zellen von *S. multivorans*. Darin konnte eine Aktivitätssteigerung bei Kultivierung mit den Substraten, die von dem jeweiligen Enzym reduziert werden, festgestellt werden. Hingegen bewirkte die Kultivierung ohne Fumarat bzw. Nitrat keinen Verlust der jeweiligen Reduktase. Offenbar scheint nur die PCE-Dehalogenase einer Langzeitregulation unterworfen zu sein.

In einigen Organismen wurde die Regulation der Expression von Genen für reduktive Dehalogenasen durch Transkriptionsfaktoren nachgewiesen (Smidt *et al.* 2000, Körner *et al.*

2003, Gábor *et al.* 2006, Pop *et al.* 2006, Tsukagoshi *et al.* 2006). Die Suche nach Proteinen, die mit spezifischen DNA-Bereichen von *S. multivorans* interagieren, führte leider nicht zum Erfolg. Die Inkubation von kurzen Nukleotidsequenzen (Abbildung 45, Seite 88) mit Rohextrakten von PceA<sup>-</sup> und PceA<sup>+</sup>-Zellen und anschließende Trennung von DNA mit gebundenen Proteinen und dem Rohextrakt erfolgte mit Magnetkugeln nach der Methode von Gerstmeir *et al.* (2004). Diese Methode war in den Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, mit einigen grundsätzlichen Problemen behaftet. Hauptsächlich standen dabei unspezifische Bindungen von Proteinen des Rohextraktes mit den DNA-Fragmenten bzw. den Magnetkugeln im Vordergrund. Deshalb konnte, trotz Optimierungsversuchen der Methodik, keine Anreicherung oder Reinigung spezifischer Proteine erreicht werden. Die Wahl der verwendeten DNA-Fragmente fiel auf den vor *pceA* stromaufwärts-liegenden und Bereich. Dabei wurden sowohl der putative Promotor von *pceAB* (-35 -10 Region), als auch die putative Ribosomenbindestelle einbezogen (Shine & Dalgarno 1974, Neumann *et al.* 1998). Viele Bindestellen für Regulatorproteine zur Transkriptionskontrolle befinden sich stromaufwärts in räumlicher Nähe vom zu exprimierenden Gen. So befindet sich beispielsweise das Bindemotiv des Transkriptionsaktivator (CprK) der *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase (CprA) in *D. dehalogenans* im Promotorbereich von *crpBA* (Smidt *et al.* 2000). Auch der Transkriptionsregulator PrdK für die PCE-Dehalogenase (PrdA) in *Desulfitobacterium* ssp. Stamm KBC1 bindet vermutlich im Promotor von *prdAB* (Tsukagoshi *et al.* 2006). Eine Möglichkeit der negativen Expressionskontrolle besteht durch Bindung eines Repressors an spezifische DNA-Sequenzen. Solche Bindemotive können kurze DNA-Tandemsequenzen (*direct repeats* / *inverted repeats*) darstellen, die sich stromaufwärts und stromabwärts vom kontrollierten Gen befinden (Narberhaus 1999). Solche *inverted repeats* sind bei Bakterien hauptsächlich in die Regulation von Genen für Hitzeschockproteine involviert (Narberhaus 1999, Derré *et al.* 1999). Allerdings wäre auch eine Beteiligung von *inverted repeats* in der Langzeitregulation der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* vorstellbar. Eine Analyse des *pceAB* Operons von *S. multivorans* inklusive von *pceAB* stromaufwärts gelegenen DNA-Bereichen mithilfe eines Berechnungsalgorithmus (REPFIND, Betley *et al.* 2002) konnten einige *inverted/direct repeats* identifiziert werden. Das könnte eine Basis für zukünftige Arbeiten darstellen.

## 4.7. Abschlussbemerkungen

PCE ist eine weit verbreitete Kontamination des Bodens und Grundwasser. Das Gram-negative  $\epsilon$ -Proteobakterium *S. multivorans* besitzt die Fähigkeit zur reduktiven Dechlorierung von PCE. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu potentiellen Umweltfaktoren, die auf den mikrobiellen Abbau halogenierter Verbindungen in Boden-Aquifer-Systemen wirken, durchgeführt. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 46 zusammengefasst.





überlebensfähig war und Sauerstoff unter Energiegewinn reduzieren konnte. Die Organohalid-Respiration war vom Redoxpotential des Mediums unbeeinflusst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Langzeitregulation der PCE-Dehalogenase bei verschiedenen Substraten in Abwesenheit von PCE oder TCE vorzufinden war.

Allerdings bleiben einige Fragen in der vorliegenden Arbeit ungeklärt. Die molekularbiologischen Mechanismen der Regulation der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* sind noch unbekannt. Die weitere Analyse des Proteoms könnte in diesem Zusammenhang Hinweise auf beteiligte Regulationsproteine liefern. Von Interesse ist außerdem, welche Elektronen-übertragenden Proteine in der Organohalid-Respiration und beim Wachstum mit Pyruvat und Sauerstoff beteiligt sind. Weiterhin steht eine detaillierte Bilanzierung der Substrate des O<sub>2</sub>-Stoffwechsels noch aus.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abraham JM, Freitag CS, Clements JR, Eisenstein BI (1985)** An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5724-5727.
- Afkhami A, Masahi S, Bahram M (2004)** Spectrophotometric Determination of Nitrite Based on Ist Reaction with *p*-Nitroaniline in the Presence of Diphenylamine in Micellar Media. *Bull Korean Chem Soc* 25: 1009-1011.
- Alexandre G (2010)** Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors. *Microbiology* 156: 2283-2293.
- Anderson RT, Lovley DR (1997)** Ecology and biogeochemistry of in situ groundwater bioremediation. *Adv Microl Ecol* 15: 289–350.
- Anneser B, Einsiedl F, Meckenstock R, Richters L, Wisotzky F, Griebler C (2008)** High-resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. *Appl Geochem* 23: 1715-1730.
- Aulenta F, Canosa A, Reale P, Rossetti S, Panero S, Majone M (2009)** Microbial Reductive Dechlorination of Trichloroethene to Ethene With Electrodes Serving as Electron Donors Without the External Addition of Redox Mediators. *Biotechnol Bioeng* 103: 85-91.
- Aulenta F, Catervi A, Majone M, Panero S, Reale P, Rossetti S (2007)** Electron Transfer from a Solid-State Electrode Assisted by Methyl Viologen Sustains Efficient Microbial Reductive Dechlorination of TCE. *Environ Sci Technol* 41: 2554-2559.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008)** The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9: 75.
- Babson AL, Babson SR (1973)** Kinetic Colorimetric Measurement of Serum Lactate Dehydrogenase Activity. *Clin Chem* 19: 766-769.
- Baedecker M, Back W (1979)** Modern marine sediments as a natural analog to the chemically stressed environment of a landfill. *J Hydrol* 43: 393-414.
- Barcelona M, Holm T (1991)** Oxidation-Reduction Capacities of Aquifer Solids. *Environ Sci Technol* 25: 1565-1572.
- Barcelona M, Holm T, Schock M, George G (1989)** Spatial and temporal gradients in aquifer oxidation-reduction conditions. *Water Resour Res* 25: 991-1003.
- Baughn AD, Garforth SJ, Vilchèze C, Jacobs WR (2009)** An Anaerobic-Type  $\alpha$ -Ketoglutarate Ferredoxin Oxidoreductase Completes the Oxidative Tricarboxylic Acid Cycle of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 5: e1000662
- Becker S, Holighaus G, Gabrielczyk T, Uden G (1996)** O<sub>2</sub> as the Regulatory Signal for FNR-Dependent Gene Regulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178: 4515-4521.
- Beers RF, Sizer IW (1952)** A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195: 133-140.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007)** Stryer. Biochemie. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag München.
- Berks BC, Palmer T, Sargent F (2005)** Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* 8: 174-181.
- Berks BC, Sargent F, Palmer T (2000)** The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* 35: 260-274.
- Bespalov VA, Zhulin IB, Taylor BL (1996)** Behavioral responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10084-10089.

- Betley JN, Frith MC, Graber JH, Choo S, Deshler JO (2002)** A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates. *Curr Biol* 12: 1756-1761.
- Bombach P, Richnow HH, Kästner M, Fischer A (2010)** Current approaches for the assessment of in situ biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 839-852.
- Bond DR, Lovley DR (2005)** Evidence for Involvement of an Electron Shuttle in Electricity Generation by *Geothrix fermentans*. *Appl Environ Microbiol* 71: 2186-2189.
- Bradford MM (1976)** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bradley PM (2000)** Microbial degradation of chloroethenes in groundwater systems. *Hydrogeology Journal* 8: 104-111.
- Brune A, Schink B (1990)** A complete citric acid cycle in assimilatory metabolism of *Pelobacter acidigallici*, a strictly anaerobic, fermenting bacterium. *Arch Microbiol* 154: 394-399.
- Bunge M, Adrian L, Kraus A, Opel M, Lorenz WG, Andreesen JR, Görisch H, Lechner U (2003)** Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature* 421: 357-360.
- Capaldi RA (1990)** Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 59: 569-596.
- Carlioz A, Touati D (1986)** Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J* 5: 623-630.
- Casadesús J, Low D (2006)** Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 830-856.
- Chang EC, Crawford BF, Hong Z, Bilinski T, Kosman DJ (1991)** Genetic and Biochemical Characterization of Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266: 4417-4424.
- Chang YC, Hatsu M, Jung K, Yoo YS, Takamizawa K (2000)** Isolation and Characterization of a Tetrachloroethylene Dechlorinating Bacterium, *Clostridium bifermentans* DPH-1. *J Biosci Bioeng* 89: 489-491.
- Charon MH, Volbeda A, Chabriere E, Pieulle L, Fontecilla-Camps JC (1999)** Structure and electron transfer mechanism of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Curr Opin Struct Biol* 9: 663-669.
- Christensen J, Baun A, Albrechtsen H, Heron G (2001)** Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *Appl Geochem* 16: 659-718.
- Christensen T, Bjerg P, Banwart S, Jakobsen R, Heron G, Albrechtsen HJ (2000)** Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. *Journal of Contaminant Hydrology* 45: 165-241.
- Comtois SL, Gidley MD, Kelly DJ (2003)** Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology (Reading, Engl)* 149: 121-129.
- Cuypers H, Viebrock-Sambale A, Zumft WG (1992)** NosR, a Membrane-Bound Regulatory Component Necessary for Expression of Nitrous Oxide Reductase in Denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* 174: 5332-5339.
- de Bruin WP, Kotterman MJ, Posthumus MA, Schraa G, Zehnder AJ (1992)** Complete Biological Reductive Transformation of Tetrachloroethene to Ethane. *Appl Environ Microbiol* 58: 1996-2000.
- de Graef M, Alexeeva S, Snoep J, Teixeira de Mattos M (1999)** The Steady-State Internal Redox State (NADH/NAD) Reflects the External Redox State and Is Correlated with Catabolic Adaptation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 2351-2357.
- de Kok A, Hengeveld AF, Martin A, Westphal AH (1998)** The pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex from Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1385: 353-366.
- De Wever H, Cole JR, Fettig MR, Hogan DA, Tiedje JM (2000)** Reductive Dehalogenation of Trichloroacetic Acid by *Trichlorobacter thiogenes* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 66: 2297-2301.

- Derré I, Rapoport G, Msadek T (1999)** CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 31: 117-31.
- DeWeerd KA, Suflita JM (1990)** Anaerobic Aryl Reductive Dehalogenation of Halobenzoates by Cell Extracts of "*Desulfomonile tiedjei*". *Appl Environ Microbiol* 56: 2999-3005.
- Diaz PI, Slakeski N, Reynolds EC, Morona R, Rogers AH, Kolenbrander PE (2006)** Role of oxyR in the Oral Anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 188: 2454-2462.
- Dilling W, Cypionka H (1990)** Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *Fems Microbiol Lett* 71: 123-127.
- DiStefano TD, Gossett JM, Zinder SH (1991)** Reductive Dechlorination of High Concentrations of Tetrachloroethene to Ethene by an Anaerobic Enrichment Culture in the Absence of Methanogenesis. *Appl Environ Microbiol* 57: 2287-2292.
- DiStefano TD, Gossett JM, Zinder SH (1992)** Hydrogen as an Electron Donor for Dechlorination of Tetrachloroethene by an Anaerobic Mixed Culture. *Appl Environ Microbiol* 58: 3622-3629.
- Dolfing J (2000)** Energetics of Anaerobic Degradation Pathways of Chlorinated Aliphatic Compounds. *Microb Ecol* 40: 2-7.
- EEA (2007)** Progress in management of contaminated sites. European Environment Agency, Copenhagen
- Else AJ, Barnes SJ, Danson MJ, Weitzman PD (1988)** A new spectrophotometric assay for citrate synthase and its use to assess the inhibitory effects of palmitoyl thioesters. *Biochem J* 251: 803-807.
- Emde R, Schink B (1990)** Enhanced Propionate Formation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* in a Three-Electrode Amperometric Culture System. *Appl Environ Microbiol* 56 (9) pp. 2771-2776.
- Fetzer S, Conrad R (1993)** Effect of redox potential on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol* 160: 108-113.
- Fetzner S (1998)** Bacterial dehalogenation. *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 633-657.
- Fink AL (1999)** Chaperone-Mediated Protein Folding. *Physiol Rev* 79: 425-449.
- Finster K, Liesack W, Tindall BJ (1997)** *Sulfurospirillum arcachonense* sp. nov., a new microaerophilic sulfur-reducing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1212-1217.
- Fletcher KE, Ritalahti KM, Pennell KD, Takamizawa K, Löffler FE (2008)** Resolution of Culture *Clostridium bifermentans* DPH-1 into Two Populations, a *Clostridium* sp. and Tetrachloroethene-Dechlorinating *Desulfitobacterium hafniense* strain JH1. *Appl Environ Microbiol* 74: 6141-6143.
- Flint DH, Smyk-Randall E, Tuminello JF, Draczynska-Lusiak B, Brown OR (1993)** The Inactivation of Dihydroxy-Acid Dehydratase in *Escherichia coli* Treated with Hyperbaric Oxygen Occurs Because of the Destruction of Its Fe-S Cluster, but the Enzyme Remains in the Cell in a Form That Can Be Reactivated. *J Biol Chem* 268: 25547-25552.
- Fournier M, Zhang Y, Wildschut JD, Dolla A, Voordouw JK, Schriemer DC, Voordouw G (2003)** Function of Oxygen Resistance Proteins in the Anaerobic, Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol* 185: 71-79.
- Freedman DL, Gossett JM (1989)** Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl Environ Microbiol* 55: 2144-2151.
- Fung JM, Morris RM, Adrian L, Zinder SH (2007)** Expression of Reductive Dehalogenase Genes in *Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195 Growing on Tetrachloroethene, Trichloroethene, or 2,3-Dichlorophenol. *Appl Environ Microbiol* 73: 4439-4445.
- Furukawa K, Suyama A, Tsuboi Y, Futagami T, Goto M (2005)** Biochemical and molecular characterization of a tetrachloroethene dechlorinating *Desulfitobacterium* sp. strain Y51: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 534-541.

- Futagami T, Goto M, Furukawa K (2008)** Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. Chemical record (New York, NY) 8: 1-12.
- Futagami T, Tsuboi Y, Suyama A, Goto M, Furukawa K (2006)** Emergence of two types of nondechlorinating variants in the tetrachloroethene-halo-respiring *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. Appl Microbiol Biotechnol 70: 720-728.
- Gábor K, Veríssimo CS, Cyran BC, ter Horst P, Meijer NP, Smidt H, de Vos WM, van der Oost J (2006)** Characterization of CprK1, a CRP/FNR-type transcriptional regulator of halo-respiration from *Desulfitobacterium hafniense*. J Bacteriol 188: 2604-2613.
- Gaspar M (2010)** Charakterisierung des Citratzyklus des  $\epsilon$ -Proteobakterium *Sulfurospirillum multivorans*. Praktikumsbericht. Jena.
- Genthner BR, Price WA, Pritchard PH (1989)** Anaerobic Degradation of Chloroaromatic Compounds in Aquatic Sediments under a Variety of Enrichment Conditions. Appl Environ Microbiol 55: 1466-1471.
- Gerritse J, Renard V, Pedro Gomes TM, Lawson PA, Collins MD, Gottschal JC (1996)** *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. Arch Microbiol 165: 132-140.
- Gerstmeir R, Cramer A, Dangel P, Schaffer S, Eikmanns BJ (2004)** RamB, a Novel Transcriptional Regulator of Genes Involved in Acetate Metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol 186: 2798-2809.
- Gibson GE, Ksiezak-Reding H, Sheu KFR, Mykytyn V, Blass JP (1984)** Correlation of Enzymatic, metabolic, and behavioral deficits in Thiamin deficiency and its reversal. Neurochem Res 9: 803.
- Gibson SA, Suflita JM (1986)** Extrapolation of Biodegradation Results to Groundwater Aquifers: Reductive Dehalogenation of Aromatic Compounds. Appl Environ Microbiol 52: 681-688.
- Gille G, Sigler K (1995)** Oxidative stress and living cells. Folia Microbiol (Praha) 40: 131-152.
- González-Flecha B, Demple B (1995)** Metabolic Sources of Hydrogen Peroxide in Aerobically Growing *Escherichia coli*. J Biol Chem 270: 13681-13687.
- Goodhew CF, ElKurdi AB, Pettigrew GW (1988)** The microaerophilic respiration of *Campylobacter mucosalis*. Biochim Biophys Acta 933: 114-123.
- Gort AS, Imlay JA (1998)** Balance between Endogenous Superoxide Stress and Antioxidant Defenses. J Bacteriol 180: 1402-1410.
- Green J, Bennett B, Jordan P, Ralph ET, Thomson AJ, Guest JR (1996)** Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro. Biochem J 316: 887-892.
- Gribble GW (1998)** Naturally occurring organohalogen compounds. Accounts Chem Res 31: 141-152.
- Griffiths SW, Cooney CL (2002)** Relationship between Protein Structure and Methionine Oxidation in Recombinant Human  $\alpha$ 1-Antitrypsin. Biochemistry 41: 6245-6252.
- Guespin-Michel J, Kaufman M (2001)** Positive feedback circuits and adaptive regulations in bacteria. Acta Biotheor 49: 207-218.
- Haddock BA, Jones CW (1977)** Bacterial respiration. Bacteriol Rev 41: 47-99.
- Haddock BA, Jones CW (1977)** Bacterial Respiration. Bacteriol Rev 41: 47-99.
- Han YH, Smibert RM, Krieg NR (1991)** *Wolinella recta*, *Wolinella curva*, *Bacteroides ureolyticus*, and *Bacteroides gracilis* Are Microaerophiles, Not Anaerobes. Int J Syst Bacteriol 41: 218-222.
- He J, Sung Y, Dollhopf M, Fathepure B, Tiedje J, Löffler F (2002)** Acetate versus Hydrogen as Direct Electron Donors To Stimulate the Microbial Reductive Dechlorination Process at Chloroethene-Contaminated Sites. Environ Sci Technol 36: 3945-3952.

- Heimann A, Jakobsen R, Blodau C (2010)** Energetic constraints on H<sub>2</sub>-dependent terminal electron accepting processes in anoxic environments: a review of observations and model approaches. *Environ Sci Technol* 44: 24-33.
- Hillmann F, Fischer R-J, Saint-Prix F, Girbal L, Bahl H (2008)** PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Mol Microbiol* 68: 848-860.
- Holliger C (1995)** The anaerobic microbiology and biotreatment of chlorinated ethenes. *Curr Opin Biotechnol* 6: 347-351.
- Holliger C, Wohlfarth G, Diekert G (1998)** Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 22: 383-398.
- Holmberg A, Blomstergren A, Nord O, Lukacs M, Lundeborg J, Uhlén M (2005)** The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* 26: 501-510.
- Hölscher T, Krajmalnik-Brown R, Ritalahti KM, Von Wintzingerode F, Görisch H, Löffler FE, Adrian L (2004)** Multiple Nonidentical Reductive-Dehalogenase-Homologous Genes Are Common in *Dehalococcoides*. *Appl Environ Microbiol* 70: 5290-5297.
- Holz G, Bergmeyer HU (1970)** Bestimmung mit Acetatkinase und Hydroxylamin In: Methoden der enzymatischen Analyse, Hrsg. Bergmeyer HU, Weinheim: Verlag Chemie: 1486-90.
- Hufnagel S (2008)** Untersuchungen zur Aerotoleranz des anaeroben, acetogenen Bakteriums *Acetobacterium dehalogenans*. Diplomarbeit. Jena.
- Imlay JA (2003)** Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57: 395-418.
- Imlay JA (2008)** How obligatory is anaerobiosis? *Mol Microbiol* 68: 801-804.
- Imlay JA, Fridovich I (1991)** Assay of Metabolic Superoxide Production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266: 6957-6965.
- Ingram-Smith C, Martin SR, Smith KS (2006)** Acetate kinase: not just a bacterial enzyme. *Trends Microbiol* 14: 249-253.
- Iuchi S (1993)** Phosphorylation/Dephosphorylation of the Receiver Module at the Conserved Aspartate Residue Controls Transphosphorylation Activity of Histidine Kinase in Sensor Protein ArcB of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268: 23972-23980.
- Iuchi S, Aristarkhov A, Dong JM, Taylor JS, Lin EC (1994)** Effects of Nitrate Respiration on Expression of the Arc-Controlled Operons Encoding Succinate Dehydrogenase and Flavin-Linked L-lactate Dehydrogenase. *J Bacteriol* 176: 1695-1701.
- Iuchi S, Lin EC (1993)** Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol Microbiol* 9: 9-15.
- Iuchi S, Weiner L (1996)** Cellular and Molecular Physiology of *Escherichia coli* in the Adaptation to Aerobic Environments. *J Biochem* 120: 1055-1063.
- JA Imlay (1995)** A Metabolic Enzyme That Rapidly Produces Superoxide, Fumarate Reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270: 19767-19777.
- Jackson R, Patterson R (1982)** Interpretation of pH and Eh trends in a fluvial-sand aquifer system. *Water Resour Res* 18: 1255-1268.
- Jacob HE (1970)** Redox Potential In *Methods in Microbiology* Vol. 2, Hrsg. Norris JR, Ribbons DW. Academic Press London, 91-125.
- Jehmlich N, Schmidt F, Hartwich M, von Bergen M, Richnow HH, Vogt C (2008)** Incorporation of carbon and nitrogen atoms into proteins measured by protein-based stable isotope probing (Protein-SIP). *Rapid Commun Mass Spectrom* 22: 2889-2897.
- Jenney FE, Verhagen MF, Cui X, Adams MW (1999)** Anaerobic Microbes: Oxygen Detoxification Without Superoxide Dismutase. *Science* 286: 306-309.

- Jensen A, Finster K (2005)** Isolation and characterization of *Sulfurospirillum carboxydovorans* sp. nov., a new microaerophilic carbon monoxide oxidizing epsilon Proteobacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87: 339-353.
- John M (2007)** Untersuchungen zur Lokalisation und Expression der PCE-Dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans*. Dissertation. Jena.
- John M, Rubick R, Schmitz RPH, Rakoczy J, Schubert T, Diekert G (2009)** Retentive Memory of Bacteria: Long-Term Regulation of Dehalorespiration in *Sulfurospirillum multivorans*. *J Bacteriol* 191: 1650-1655.
- John M, Schmitz RPH, Westermann M, Richter W, Diekert G (2006)** Growth substrate dependent localization of tetrachloroethene reductive dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans*. *Arch Microbiol* 186: 99-106.
- Jones DP, Go Y-M, Anderson CL, Ziegler TR, Kinkade JM, Kirlin WG (2004)** Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *FASEB J* 18: 1246-1248.
- Kaden J, Galushko AS, Schink B (2002)** Cysteine-mediated electron transfer in syntrophic acetate oxidation by cocultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Wolinella succinogenes*. *Arch Microbiol* 178: 53-58.
- Karnholz A, Küsel K, Gößner A, Schramm A, Drake HL (2002)** Tolerance and Metabolic Response of Acetogenic Bacteria toward Oxygen. *Appl Environ Microbiol* 68: 1005-1009.
- Kawasaki S, Watamura Y, Ono M, Watanabe T, Takeda K, Niimura Y (2005)** Adaptive Responses to Oxygen Stress in Obligatory Anaerobes *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium aminovalericum*. *Appl Environ Microbiol* 71: 8442-8450.
- KB Gregory, DR Bond, DR Lovley (2004)** Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ Microbiol* 6: 596-604.
- Kern M, Mager AM, Simon J (2007)** Role of individual nap gene cluster products in NapC-independent nitrate respiration of *Wolinella succinogenes*. *Microbiology (Reading, Engl)* 153: 3739-3747.
- Kodama Y, Ha LT, Watanabe K (2007)** *Sulfurospirillum cavolei* sp. nov., a facultatively anaerobic sulfur-reducing bacterium isolated from an underground crude oil storage cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 827-831.
- Körner H, Sofia HJ, Zumft WG (2003)** Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* 27: 559-592.
- Kovacs N (1956)** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the Oxidase Reaction. *Nature* 178: 703.
- Krajmalnik-Brown R, Hölscher T, Thomson IN, Saunders FM, Ritalahti KM, Löffler FE (2004)** Genetic Identification of a Putative Vinyl Chloride Reductase in *Dehalococcoides* sp. Strain BAV1. *Appl Environ Microbiol* 70: 6347-6351.
- Krauter H (2006)** Untersuchungen zur Beteiligung membranständiger redoxaktiver Komponenten bei der Dehalorespiration in *Sulfurospirillum multivorans*. Diplomarbeit. Jena
- Kroll JS, Langford PR, Wilks KE, AD Keil (1995)** Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! *Microbiology* 141: 2271-2279.
- Kube M, Beck A, Zinder SH, Kuhl H, Reinhardt R, Adrian L (2005)** Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nat Biotechnol* 23: 1269-1273.
- Küsel K, Drake HL (1995)** Effects of Environmental Parameters on the Formation and Turnover of Acetate by Forest Soils. *Appl Environ Microbiol* 61: 3667-3675.

- Küsel K, Karnholz A, Trinkwalter T, Devereux R, Acker G, Drake HL (2001)** Physiological Ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an Aerotolerant Acetogen Isolated from Sea Grass Roots. Appl Environ Microbiol 67: 4734-4741.
- La Carbona S, Sauvageot N, Giard JC, Benachour A, Posteraro B, Auffray Y, Sanguinetti M, Hartke A (2007)** Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*. Mol Microbiol 66: 1148-1163.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Laszlo DJ, Taylor BL (1981)** Aerotaxis in *Salmonella typhimurium*: Role of Electron Transport. J Bacteriol 145: 990-1001.
- Liu S, Suflita JM (1993)** Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. Trends Biotechnol 11: 344-352.
- Löffler FE, Tiedje JM, Sanford RA (1999)** Fraction of Electrons Consumed in Electron Acceptor Reduction and Hydrogen Thresholds as Indicators of Halorespiratory Physiology. Appl Environ Microbiol 65: 4049-4056.
- Lombard M, Fontecave M, Touati D, Nivière V (2000)** Reaction of the Desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with Superoxide Anion. Evidence for a Superoxide Reductase Activity. J Biol Chem 275: 115-121.
- Lorenzen J, Kröger A, Unden G (1993)** Regulation of anaerobic respiratory pathways in *Wolinella succinogenes* by the presence of electron acceptors. Arch Microbiol 159: 477-483.
- Lorenzen J, Steinwachs S, Unden G (1994)** DMSO respiration by the anaerobic rumen bacterium *Wolinella succinogenes*. Arch Microbiol 162: 277-281.
- Lovley DR (2001)** Bioremediation. Anaerobes to the rescue. Science 293: 1446-1446.
- Luijten MLGC, de Weert J, Smidt H, Boschker HTS, de Vos WM, Schraa G, Stams AJM (2003)** Description of *Sulfurospirillum halorespirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53: 787-793.
- Luijten MLGC, Roelofsen W, Langenhoff AAM, Schraa G, Stams AJM (2004)** Hydrogen threshold concentrations in pure cultures of halo-respiring bacteria and at a site polluted with chlorinated ethenes. Environ Microbiol 6: 646-650.
- Lumppio H, Shenvi N, Summers A, Voordouw G (2001)** Rubrerythrin and Rubredoxin Oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a Novel Oxidative Stress Protection System. J Bacteriol 183: 101-108.
- Mai X, Adams MW (1996)** Characterization of a fourth type of 2-keto acid-oxidizing enzyme from a hyperthermophilic archaeon: 2-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus litoralis*. J Bacteriol 178: 5890-5896.
- Massey V, Strickland S, Mayhew SG, Howell LG, Engel PC, Matthews RG, Schuman M, Sullivan PA (1969)** The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. Biochem Biophys Res Commun 36: 891-897.
- May A, Hillmann F, Riebe O, Fischer R-J, Bahl H (2004)** A rubrerythrin-like oxidative stress protein of *Clostridium acetobutylicum* is encoded by a duplicated gene and identical to the heat shock protein Hsp21. FEMS Microbiol Lett 238: 249-254.
- Maymó-Gatell X, Chien Y, Gossett JM, Zinder SH (1997)** Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene. Science 276: 1568-1571.
- Maymó-Gatell X, Tandoi V, Gossett JM, Zinder SH (1995)** Characterization of an H<sub>2</sub>-Utilizing Enrichment Culture That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Vinyl Chloride and Ethene in the Absence of Methanogenesis and Acetogenesis. Appl Environ Microbiol 61: 3928-3933.



- McCord J, Fridovich I (1969)** Superoxide Dismutase - An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
- McCord JM, Keele BB, Fridovich I (1971)** An Enzyme-Based Theory of Obligate Anaerobiosis: the Physiological Function of Superoxide Dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1024-1027.
- Messner KR, Imlay JA (1999)** The Identification of Primary Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation in the Aerobic Respiratory Chain and Sulfite Reductase Complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274: 10119-10128.
- Messner KR, Imlay JA (2002)** Mechanism of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation by Fumarate Reductase, Succinate Dehydrogenase, and Aspartate Oxidase. *J Biol Chem* 277: 42563-42571.
- Miller E, Wohlfarth G, Diekert G (1996)** Studies on tetrachloroethene respiration in *Dehalospirillum multivorans*. *Arch Microbiol* 166: 379-387.
- Miller E, Wohlfarth G, Diekert G (1997)** Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfotobacterium* sp. strain PCE-S. *Arch Microbiol* 168: 513-519.
- Miller JB, Koshland DE (1977)** Sensory electrophysiology of bacteria: Relationship of the membrane potential to motility and chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4752-4756.
- Minghetti KC, Gennis RB (1988)** The Two Terminal Oxidases of the Aerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli* Each Yield Water and Not Peroxide as a Final Product. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 243-248.
- Mohn WW, Tiedje JM (1990)** Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. *Arch Microbiol* 153: 267-271.
- Mohn WW, Tiedje JM (1992)** Microbial Reductive Dehalogenation. *Microbiol Rev* 56: 482-507.
- Müller JA, Rosner BM, Von Abendroth G, Meshulam-Simon G, McCarty PL, Spormann AM (2004)** Molecular Identification of the Catabolic Vinyl Chloride Reductase from *Dehalococcoides* sp. Strain VS and Its Environmental Distribution. *Appl Environ Microbiol* 70: 4880-4888.
- Munujos P, Coll-Cantí J, González-Sastre F, Gella FJ (1993)** Assay of Succinate Dehydrogenase Activity by a Colorimetric-Continuous Method Using Iodonitrotetrazolium Chloride as Electron Acceptor. *Anal Biochem* 212: 506-509.
- Murarka A, Clomburg JM, Moran S, Shanks JV, Gonzalez R (2010)** Metabolic analysis of wild-type *Escherichia coli* and a pyruvate dehydrogenase complex (PDHC)-deficient derivative reveals the role of PDHC in the fermentative metabolism of glucose. *J Biol Chem* 285: 31548-31558.
- Narberhaus F (1999)** Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol Microbiol* 31: 1-8.
- Neumann A, Scholz-Muramatsu H, Diekert G (1994)** Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch Microbiol* 162: 295-301.
- Neumann A, Siebert A, Trescher T, Reinhardt S, Wohlfarth G, Diekert G (2002)** Tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*: substrate specificity of the native enzyme and its corrinoid cofactor. *Arch Microbiol* 177: 420-426.
- Neumann A, Wohlfarth G, Diekert G (1995)** Properties of tetrachloroethene and trichloroethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch Microbiol* 163: 276-281.
- Neumann A, Wohlfarth G, Diekert G (1996)** Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *J Biol Chem* 271: 16515-16519.
- Neumann A, Wohlfarth G, Diekert G (1998)** Tetrachloroethene Dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: Cloning, Sequencing of the Encoding Genes, and Expression of the pceA Gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 4140-4145.
- Nevatalo LM, Bijmans MFM, Lens PNL, Kaksonen AH, Puhakka JA (2010)** Hydrogenotrophic Sulfate Reduction in a Gas-Lift Bioreactor Operated at 9 °C. *J Microbiol Biotechnol* 20: 615-621.

- Nevin KP, Holmes DE, Woodard TL, Covalla SF, Lovley DR (2007)** Reclassification of *Trichlorobacter thiogenes* as *Geobacter thiogenes* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 463-436.
- O'Leary V, Solberg M (1976)** Effect of Sodium Nitrite Inhibition on Intracellular Thiol Groups and on the Activity of Certain Glycolytic Enzymes in *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol* 31: 208-212.
- Pan N, Imlay JA (2001)** How does oxygen inhibit central metabolism in the obligate anaerobe *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Mol Microbiol* 39: 1562-1571.
- Perrenoud A, Sauer U (2005)** Impact of Global Transcriptional Regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on Glucose Catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 3171-3179.
- Pop SM, Gupta N, Raza AS, Ragsdale SW (2006)** Transcriptional activation of dehalorespiration. Identification of redox-active cysteines regulating dimerization and DNA binding. *J Biol Chem* 281: 26382-26390.
- Pop SM, Kolarik RJ, Ragsdale SW (2004)** Regulation of anaerobic dehalorespiration by the transcriptional activator CprK. *J Biol Chem* 279: 49910-49908.
- Rabin RS, Stewart V (1993)** Dual Response Regulators (NarL and NarP) Interact with Dual Sensors (NarX and NarQ) to Control Nitrate- and Nitrite-Regulated Gene Expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 175: 3259-3268.
- Reed L, Willms C (1966)** Purification and Resolution of the Pyruvate Dehydrogenase Complex (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol* 9: 247-265.
- Reinhold A (2008)** Untersuchungen zur Regulation und Lokalisation der PCE-Dehalogenase in *Desulfitobacterium hafniense* Stamm PCE-S und *Desulfitobacterium hafniense* Stamm Y51. Diplomarbeit. Jena.
- Riboulet E, Verneuil N, La Carbona S, Sauvageot N, Auffray Y, Hartke A, Giard JC (2007)** Relationships between oxidative stress response and virulence in *Enterococcus faecalis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13: 140-146.
- Rich PR (2003)** The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans* 31: 1095-1105.
- Riebe O, Fischer RJ, Bahl H (2007)** Desulfoferrodoxin of *Clostridium acetobutylicum* functions as a superoxide reductase. *FEBS Lett* 581: 5605-5610.
- Riebe O, Fischer RJ, Wampler DA, Kurtz DM, Bahl H (2009)** Pathway for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> detoxification in *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology* 155: 16-24.
- Rocha ER, Owens G, Smith CJ (2000)** The Redox-Sensitive Transcriptional Activator OxyR Regulates the Peroxide Response Regulon in the Obligate Anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 182: 5059-5069.
- Rocha ER, Smith CJ (1999)** Role of the Alkyl Hydroperoxide Reductase (*ahpCF*) Gene in Oxidative Stress Defense of the Obligate Anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 181: 5701-5710.
- Röling WFM, van Verseveld HW (2002)** Natural attenuation: what does the subsurface have in store? *Biodegradation* 13: 53-64.
- Roth JR, Lawrence JG, Bobik TA (1996)** COBALAMIN (COENZYME B<sub>12</sub>): Synthesis and Biological Significance. *Annu Rev Microbiol* 50: 137-181.
- Rowe J, Yarbrough J, Rake J, Eagon R (1979)** Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Curr Microbiol* 2: 51-54.
- Sakai S, Yagishita T (2007)** Microbial Production of Hydrogen and Ethanol From Glycerol-Containing Wastes Discharged From a Biodiesel Fuel Production Plant in a Bioelectrochemical Reactor with Thionine. *Biotechnol Bioeng* 98: 340-348.
- Salmon K, Hung S-P, Mekjian K, Baldi P, Hatfield GW, Gunsalus RP (2003)** Global Gene Expression Profiling in *Escherichia coli* K12. The Effects of Oxygen Availability and FNR. *J Biol Chem* 278: 29837-29855.

- Santos H, Fareleira P, Xavier AV, Chen L, Liu MY, LeGall J (1993)** Aerobic metabolism of carbon reserves by the "obligate anaerobe" *Desulfovibrio gigas*. Biochem Biophys Res Commun 195: 551-557.
- Saunders NF, Houben EN, Koefoed S, de Weert S, Reijnders WN, Westerhoff HV, De Boer AP, Van Spanning RJ (1999)** Transcription regulation of the *nir* gene cluster encoding nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* involves NNR and NirI, a novel type of membrane protein. Mol Microbiol 34: 24-36.
- Schmitz RPH, Diekert G (2003)** Purification and properties of the formate dehydrogenase and characterization of the *fdhA* gene of *Sulfurospirillum multivorans*. Arch Microbiol 180: 394-401.
- Schmitz RPH, Diekert G (2004)** The *fdh* operon of *Sulfurospirillum multivorans*. FEMS Microbiol Lett 237: 235-242.
- Scholz-Muramatsu H, Neumann A, Meßmer M, Moore E, Diekert G (1995)** Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. Arch Microbiol 163: 48-56.
- Schubert T, Adrian L, Tarkka M, Wubert T, Diekert G (2010)** Genomsequenz von *Sulfurospirillum multivorans*, unpubliziert
- Schuppert B, Schink B, Trösch W (1992)** Batch and continuous production of propionic acid from whey permeate by *Propionibacterium acidipropionici* in a three-electrode amperometric culture system. Appl Microbiol Biotechnol 37: 549-553.
- Schwoerbel J, Brendelberger H (2005)** Einführung in die Limnologie. 9. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag München.
- Seshadri R, Adrian L, Fouts DE, Eisen JA, Phillippy AM, Methe BA, Ward NL, Nelson WC, Deboy RT, Khouri HM, Kolonay JF, Dodson RJ, Daugherty SC, Brinkac LM, Sullivan SA, Madupu R, Nelson KE, Kang KH, Impraim M, Tran K, Robinson JM, Forberger HA, Fraser CM, Zinder SH, Heidelberg JF (2005)** Genome Sequence of the PCE-Dechlorinating Bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. Science 307: 105-108.
- Sharma PK, McCarty PL (1996)** Isolation and Characterization of a Facultatively Aerobic Bacterium That Reductively Dehalogenates Tetrachloroethene to *cis*-1,2-Dichloroethene. Appl Environ Microbiol 62: 761-765.
- Shimomura T, Sanford RA (2005)** Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene in a Sand Reactor Using a Potentiostat. J Environ Qual 34: 1435-1438.
- Shine J, Dalgarno L (1974)** The 3'-Terminal Sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. Proc Natl Acad Sci USA 71: 1342-1346.
- Shioi J, Taylor BL (1984)** Oxygen Taxis and Proton Motive Force in *Salmonella typhimurium*. J Biol Chem 259: 10983-10988.
- Shioi J, Tribhuwan RC, Berg ST, Taylor BL (1988)** Signal Transduction in Chemotaxis to Oxygen in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 170: 5507-5511.
- Siebert A (2002)** Norpseudovitamin B<sub>12</sub>: ein neuartiger Corrinoide-Cofaktor aus der reduktiven PCE-Dehalogenase von *Dehalospirillum multivorans*. Dissertation. Jena.
- Siebert A, Neumann A, Schubert T, Diekert G (2002)** A non-dechlorinating strain of *Dehalospirillum multivorans*: evidence for a key role of the corrinoide cofactor in the synthesis of an active tetrachloroethene dehalogenase. Arch Microbiol 178: 443-449.
- Smidt H, de Vos WM (2004)** Anaerobic Microbial Dehalogenation. Annu Rev Microbiol 58: 43-73.
- Smidt H, van Leest M, van der Oost J, de Vos WM (2000)** Transcriptional Regulation of the *cpr* Gene Cluster in *ortho*-Chlorophenol-Respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. J Bacteriol 182: 5683-5691.

- Smith MA, Mendz GL, Jorgensen MA, Hazell SL (1999)** Fumarate metabolism and the microaerophily of *Campylobacter* species. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 961-975.
- Snoep J, de Graef M, Westphal A, de Kok A, Teixeira de Mattos M, Neijssel O (1993)** Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*: Implications for their activity in vivo. *FEMS Microbiol Lett* 114: 279-283.
- Snoep J, Teixeira de Mattos M, Postma P, Neijssel O (1990)** Involvement of pyruvate dehydrogenase in product formation in pyruvate-limited anaerobic chemostat cultures of *Enterococcus faecalis* NCTC 775. *Arch Microbiol* 154: 50-55.
- Spiro S, Guest JR (1990)** FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 6: 399-428.
- Spiro S, Guest JR (1991)** Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 16: 310-314.
- Stams AJM, de Bok FAM, Plugge CM, van Eekert MHA, Dolfing J, Schraa G (2006)** Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environ Microbiol* 8: 371-382.
- Stewart V (1993)** Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 9: 425-434.
- Stuart S, Woods S, Lemmon T, Ingle J (1999)** The Effect of Redox Potential Changes on Reductive Dechlorination of Pentachlorophenol and the Degradation of Acetate by a Mixed, Methanogenic Culture. *Biotechnol Bioeng* 63: 69-78.
- Stupp HD, Bakenhus A, Gass M, Hüttmann S, Engelmann FI (2007)** Biologische Verfahren zur Sanierung von CKW-Grundwasserschäden – Systematik und Beschreibung der In-Situ-Techniken. *Altlasten Spektrum* 3: 101-110.
- Suflita J, Miller G (1985)** Microbial metabolism of chlorophenolic compounds in ground water aquifers. *Environ Toxicol Chem* 4: 751-758.
- Sun B, Cole JR, Sanford RA, Tiedje JM (2000)** Isolation and Characterization of *Desulfovibrio dechloracetivorans* sp. nov., a Marine Dechlorinating Bacterium Growing by Coupling the Oxidation of Acetate to the Reductive Dechlorination of 2-Chlorophenol. *Appl Environ Microbiol* 66: 2408-2413.
- Sung Y, Ritalahti KM, Sanford RA, Urbance JW, Flynn SJ, Tiedje JM, Löffler FE (2003)** Characterization of Two Tetrachloroethene-Reducing, Acetate-Oxidizing Anaerobic Bacteria and Their Description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 69: 2964-2974.
- Suyama A, Iwakiri R, Kai K, Tokunaga T, Sera N, Furukawa K (2001)** Isolation and Characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 Capable of Efficient Dehalogenation of Tetrachloroethene and Polychloroethanes. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 1474-1481.
- Suyama A, Yamashita M, Yoshino S, Furukawa K (2002)** Molecular Characterization of the PceA Reductive Dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. Strain Y51. *J Bacteriol* 184: 3419-34125.
- Townsend GT, Ramanand K, Suflita JM (1997)** Reductive Dehalogenation and Mineralization of 3-Chlorobenzoate in the Presence of Sulfate by Microorganisms from a Methanogenic Aquifer. *Appl Environ Microbiol* 63: 2785-2791.
- Townsend GT, Suflita JM (1997)** Influence of sulfur oxyanions on reductive dehalogenation activities in *Desulfomonile tiedjei*. *Appl Environ Microbiol* 63: 3594-3599.
- True HL, Berlin I, Lindquist SL (2004)** Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature* 431: 184-187.
- Tseng CP, Albrecht J, Gunsalus RP (1996)** Effect of Microaerophilic Cell Growth Conditions on Expression of the Aerobic (*cyoABCDE* and *cydAB*) and Anaerobic (*narGHJI*, *frdABCD*, and *dmsABC*) Respiratory Pathway Genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178: 1094-1098.

- Tsukagoshi N, Ezaki S, Uenaka T, Suzuki N, Kurane R (2006)** Isolation and transcriptional analysis of novel tetrachloroethene reductive dehalogenase gene from *Desulfitobacterium* sp. strain KBC1. Appl Microbiol Biotechnol 69: 543-553.
- Umweltbundesamt (2006)** Gesundheitliche Aspekte der Trinkwasser-Installation.
- Unden G, Becker S, Bongaerts J, Schirawski J, Six S (1994)** Oxygen regulated gene expression in facultatively anaerobic bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 66: 3-22.
- Unden G, Bongaerts J (1997)** Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. Biochim Biophys Acta 1320: 217-234.
- Unden G, Schirawski J (1997)** The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions. Mol Microbiol 25: 205-210.
- Unden G, Trageser M (1991)** Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: Control of anaerobic respiration by the FNR protein. Antonie van Leeuwenhoek 59: 65-76.
- US EPA (2004)** Cleaning Up the Nation's Waste Sites: Markets and Technology Trends. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington DC
- Uyeda K, Rabinowitz JC (1971)** Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase. 3. Purification and properties of the enzyme. J Biol Chem 246: 3111-3119.
- van Beek CGEM, Puffelen VJ (1987)** Changes in the chemical composition of drinking water after well infiltration in an unconsolidated sandy aquifer. Water Resour Res 23: 69-76.
- van Loon AP, Pesold-Hurt B, Schatz G (1986)** A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. Proc Natl Acad Sci USA 83: 3820-3824.
- van Niel EW, Gottschal JC (1998)** Oxygen Consumption by *Desulfovibrio* Strains with and without Polyglucose. Appl Environ Microbiol 64: 1034-1039.
- van Vliet AH, Baillon ML, Penn CW, Ketley JM (1999)** *Campylobacter jejuni* Contains Two Fur Homologs: Characterization of Iron-Responsive Regulation of Peroxide Stress Defense Genes by the PerR Repressor. J Bacteriol 181: 6371-6376.
- Velghe N, Claeys A (1985)** Rapid Spectrophotometric Determination of Nitrate in Mineral Waters with Resorcinol. Analyst 110: 313-314.
- Vogel TM, Criddle CS, McCarty PL (1987)** Transformations of halogenated aliphatic compounds. Environ Sci Technol 21: 722-736.
- Wilson GS (1978)** Determination of oxidation-reduction potentials. Methods Enzymol LIV: 396-410.
- Winderl C, Anneser B, Griebler C, Meckenstock RU, Lueders T (2008)** Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. Appl Environ Microbiol 74: 792-801.
- Wohlfarth G, Diekert G (1997)** Anaerobic dehalogenases. Curr Opin Biotechnol 8: 290-295.
- Yamanaka T, Okunuki K (1963)** Crystalline Pseudomonas cytochrome oxidase. I. Enzymic properties with special reference to the biological specificity. Biochim Biophys Acta 67: 379-393.
- Yamanaka T, Okunuki K (1970)** Isolation of a cytochrome peroxidase from *Thiobacillus novellus*. Biochim Biophys Acta 220: 354-356.
- Yang Y, McCarty P (1998)** Competition for Hydrogen within a Chlorinated Solvent Dehalogenating Anaerobic Mixed Culture. Environ Sci Technol 32: 3591-3597.
- Yarbrough JM, Rake JB, Eagon RG (1980)** Bacterial inhibitory effects of nitrite: inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. Appl Environ Microbiol 39: 831-834.

- Ye L, Schilhabel A, Bartram S, Boland W, Diekert G (2010)** Reductive dehalogenation of brominated ethenes by *Sulfurospirillum multivorans* and *Desulfitobacterium hafniense* PCE-S. Environ Microbiol 12: 501-509.
- Youngster LKG, Rosell M, Richnow HH, Häggblom MM (2010)** Assessment of MTBE biodegradation pathways by two-dimensional isotope analysis in mixed bacterial consortia under different redox conditions. Appl Microbiol Biotechnol 88: 309-317.
- Zehnder AJ, Wuhrmann K (1976)** Titanium (III) Citrate as a Nontoxic Oxidation-Reduction Buffering System for the Culture of Obligate Anaerobes. Science 194: 1165-1166.

## **6. Anhang**

### **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Januar 2005 und Februar 2010 am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Gabriele Diekert angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich bei ihr für das interessante Thema meiner Dissertation, für die fachliche und zeitintensive Betreuung sowie für ihre stete Diskussionsbereitschaft und Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung, hilfreichen Ratschläge und anregenden Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Torsten Schubert bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Roland Schmitz für seine Hilfestellung bei den Untersuchungen zum Redoxpotential. Peggy Brandt danke ich für großartige Unterstützung im Labor.

Für die Nutzungsmöglichkeit des Gaschromatographen und die hilfreichen Diskussionen danke ich Frau Prof. Dr. Kirsten Küsel und Dr. Marco Reiche. Für die Durchführung der Proteomanalysen möchte ich Prof. Martin von Bergen und Dr. Jana Seifert besonders danken. Herrn Prof. Dr. Bernhard Schink danke ich für die Leihgabe des Potentiostaten. Bei Dr. Manfred Rudolph möchte ich mich die hilfreiche Einführung in die Welt der Elektroden und Potentiostaten bedanken.

Vielen Dank allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie für die tolle Arbeitsatmosphäre, die hervorragende Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Yvonne, Sandra, Sandra, Anika, Lidan, Markus, Jörg und alle anderen: vielen Dank für die schöne gemeinsame Zeit.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, sowie meinem Familien- und Freundeskreis und vor allem meinem Lebenspartner Kai-Uwe. Ohne deren Unterstützung und ihr Verständnis wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Raffael Rubick, geboren am 24. März 1976, dass mir die für die Biologisch- Pharmazeutische Fakultät geltende Promotionsordnung bekannt ist. Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und außer den angegebenen keine Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen oder Quellen eingesetzt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Es wurden von mir keine geldwerten Leistungen erbracht, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Dissertation wurde nur dem Fakultätsrat der Biologisch- Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena und keiner anderen Hochschule zur wissenschaftlichen Prüfung oder zur Dissertation eingereicht. Diese Arbeit ist weder identisch noch teildentisch mit einer Arbeit, welche der Friedrich-Schiller-Universität Jena oder einer anderen Hochschule zur Dissertation vorgelegt worden ist.

Jena, 3. November 2010

Raffael Rubick



## Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

### Publikationen

**Markus John\*, Raffael Rubick\*, Roland P. H. Schmitz, Jana Rakoczy, Torsten Schubert, Gabriele Diekert (2009)** Retentive Memory of Bacteria: Long-Term Regulation of Dehalorespiration in *Sulfurospirillum multivorans*. J Bacteriol 191: 1650-1655.

\* Markus John und Raffael Rubick geteilte Erstautorenschaft

### Vortrag

**2008 AXIOM-VIBE-eTRAP-HIGHGRADE Workshop „Electron transfer processes at biochemical gradients“**

The influence of the redox potential on the reductive dehalogenation of tetrachloroethene of *Sulfurospirillum multivorans*

### Posterpräsentationen

**2010 Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)**

Anita MacNelly, Raffael Rubick, Jana Seifert, Martin von Bergen, Torsten Schubert, Gabriele Diekert: Impact of different electron acceptors on the tetrachloroethene reductive dehalogenase gene expression in *Sulfurospirillum multivorans*

**2008 VAAM**

Raffael Rubick, Roland P. H. Schmitz, Gabriele Diekert: The influence of the redox potential on the reductive dehalogenation of tetrachlorethene of *Sulfurospirillum multivorans*

**2007 VAAM**

Raffael Rubick, Roland P. H. Schmitz, Gabriele Diekert: The influence of the redox potential on growth and dehalorespiration of *Sulfurospirillum multivorans* in a potentiostatic culture system

**2006 AXIOM-Virtual Institute, Spring School, Umweltforschungszentrum Leipzig / VAAM**

Raffael Rubick, Roland P. H. Schmitz and Gabriele Diekert: The influence of a steady redox state on the reductive dehalogenation of PCE in pure cultures of *Sulfurospirillum multivorans*